

特 別 研 究「放射線の確率的影響と  
リスク評価に関する総合的調査研究」

(昭和58～62年度)

最 終 報 告 書

平成元年 3 月

放射線医学総合研究所

# Final Report on the Project Research “Stochastic Effects of Irradiation and Risk Estimation”

(April 1983~March 1988)

March 1989



National Institute of Radiological Sciences

9-1, Anagawa 4—chome, Chiba 260, Japan

## 序

本特別研究は、昭和57年度に終了した特別研究、「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の後を受けて、昭和58年度から62年度迄の5年間に遂行されたものである。前特別研究同様3グループから成るが、晩発障害についてはこれを発がん一本にしぼり、特にヒトにおける疫学データを補完する実験と、白血病についての研究を重点課題とした。

遺伝的リスク評価については、カニクイザルの雄生殖細胞（幹精原細胞）における放射線誘発染色体異常の線量効果関係および低線量率効果に重点をおき、低線量、低線量率放射線のヒトに対する遺伝的リスク評価のための基礎的知見を得ることに努めた。

また、内部被曝評価については、吸入実験施設が完成し、短寿命放射性粒子の吸入実験が実施され、一方培養肺マクロファージによる *in vitro* の実験系も確立された。

本特別研究を遂行するに当って最も意を用いたのは、近年発展の著じるしい遺伝子解析をはじめとする種々の最新研究手法を導入する事により、本研究所の研究能力の向上を図ること、又がんについての視野を拓げるのに役立つ様な基礎研究の幾つかを包含し発展させることであった。

これ等の意図の幾つかは達成されたものと信ずる。

研究成果については、各研究グループの概説に詳しいので省略するが、各分野において幾つかの重要な新知見が得られたのは嬉ばしい限りである。

特別研究班長 関 正 利

# 目 次

特別研究「放射線の確率的影響とリスク評価に関する総合的調査研究」序  
関 正利

I 放射線による発がんとその変更要因に関する調査研究 概説	佐渡 敏彦	1
Studies on Radiation Carcinogenesis : Its Modifying Factors and Mechanisms. A Review of the Past Five Years' Program	T. Sado	
1. 放射線発がんによぼす線質の影響 (特に速中性子線による)	大津 裕司, 古瀬 健, 野田 攸子 小林 森, 丸山 隆司, 佐藤 文昭	6
Serial Sacrifice Study on Tumorigenesis in Male C57BL/6J Mice Exposed to Gamma-ray or Fast Neutron Radiation	H. Otsu, T. Furuse, Y. Noda, S. Kobayashi, T. Maruyama and F. Sato	
2. 放射線による腫瘍発生スペクトラムの変化によぼす生物学的要因の影響に関する研究	佐々木俊作	11
Influence of Biological Variables on Radiation Carcinogenesis	S. Sasaki	
3. 放射線誘発リンパ性白血病の発生機序に関する研究	武藤 正弘, 久保あい子, 神作 仁子, 佐渡 敏彦	23
Studies on Radiation-Induced Thymic Lymphomagenesis in B10 Strain Mice	M. Muto, E. Kubo, H. Kamisaku and T. Sado	
4. 放射線誘発骨髄性白血病の病理学的研究	吉田 和子, 西村まゆみ, 根本久美恵, 関 正利	32
Modifying Factors of Radiation Induced Myeloid Leukemia of C3H/He Mouse	K. Yoshida, M. Nishimura, K. Nemoto and M. Seki	
5. 放射線誘発白血病の発生機序に関する細胞動態学的研究	中尾 愚, 鈴木 元, 川瀬 淑子, 能勢 正子 今井 康文, 平嶋 邦猛, 別所 正美	41
Cell Kinetic Studies on Radiation Induced Leukemogenesis	I. Nakao, G. Suzuki, Y. Kawase, M. Nose, Y. Imai, K. Hirashima and M. Bessho	
6. 放射線による発がん機構の細胞遺伝学的研究	早田 勇, 市川やよい, 南久松真子, 石原 隆昭	48
Cytogenetical Studies on the Mechanism of Radiation Induced Neoplasms	I. Hayata, Y. Ichikawa, M. Minamihisamatsu and T. Ishihara	

7. ゲノムの遺伝的安定性に関する分子生物学的研究

堀 雅明, 高橋 永一, 辻 秀雄, 辻 さつき ..... 57

Molecular Biological Study on Genetic Stability of the Genome

T. Hori, E. Takahashi, H. Tsuji and S. Tsuji

8. 正常細胞ならびに変異細胞の増殖分化統御因子の研究

色田 幹雄, 常岡 和子, 石原 弘 ..... 65

Protein Factors Regulating Proliferation and Differentiation of Normal and Neoplastic Cells

M. Shikita, K. Tsuneoka and H. Ishihara

II ヒトの遺伝的リスクの評価に関する調査研究 概説

戸張 敏夫 ..... 73

General Activities of Genetic Effects Research Group

I. Tobari

1. 霊長類による放射線誘発染色体異常のリスク推定の研究

戸張 敏夫, 松田 洋一, 宇津木豊子, 中井 斌 ..... 76

Studies on Dose-Response Relationships for Induction of Chromosome Aberrations in Stem-spermatogonia of the Crab-eating Monkey after Low and High Dose-rate  $\gamma$ -irradiation

I. Tobari, Y. Matsuda, T. Utsugi and S. Nakai

2. 培養細胞によるヒト放射線突然変異のリスク推定の研究

佐藤 弘毅, 稲葉 浩子, 堀 雅明, 塩見 忠博

甲斐(伊藤)陽美, 沢田 文夫, 森明 充興, 東 智康 ..... 84

Risk Estimation of Radiation Mutagenesis in Man by Using Cultured Mammalian Cells

K. Sato, H. Hama-Inaba, T. Hori, T. Shiomi, A. Ito-Kai,  
F. Sawada, M. Morimyo and T. Higashi

3. 放射線による遺伝障害の検出システムの開発に関する研究

岡本 正則, 北爪 雅之, 戸張 敏夫 ..... 91

Effects of Ionizing Radiation on Male Germ Cells of Crab-eating Monkey

M. Okamoto, M. Kitazume and I. Tobari

III 内部被曝影響評価に関する調査研究 概説

松岡 理 ..... 99

General Activities of Rediotoxicology Research Group

O. Matsuoka

1. 粒子状物質の生体内挙動、代謝に関する研究

高橋千太郎, 久保田善久, 松岡 理 ..... 102

Movement and Metabolism of Radioactive Particles in the Respiratory Tract

S. Takahashi, Y. Kubota and O. Matsuoka

2. アルファ放射体による内部被曝線量の測定と算定に関する研究

石樽 信人, 関口 昌道, 仲野 高志, 松岡 理 ..... 110

Studies on Dosimetry for Internally Deposited Alpha-Emitters

N. Ishigure, M. Sekiguchi, T. Nakano and O. Matsuoka

3. 内部被ばくの影響に関する比較動物学的研究

小木曾洋一, 福田 俊, 飯田 治三  
山田 裕司, 久保田善久, 松岡 理 ..... 120

Comparative Toxicological Studies on the Effects of Internal Exposures  
Y. Oghiso, S. Fukuda, H. Iida, Y. Yamada,  
Y. Kubota and O. Matsuoka

4. アルファ廃棄物の処理技術に関する研究

小泉 彰, 山田 裕司, 宮本 勝宏 ..... 136

Studies on Treatment of Alpha-Radioactive Wastes  
A. Koizumi, Y. Yamada and K. Miyamoto

5. 放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研究

山田 裕司, 久保田善久, 福田 俊  
小木曾洋一, 飯田 治三, 松岡 理 ..... 145

Methodological Studies on the Inhalation of Radioactive Aerosols  
Y. Yamada, Y. Kubota, S. Fukuda,  
Y. Oghiso, H. Iida and O. Matsuoka

6. 超ウラン元素の生体除染に関する研究

松岡 理, 佐藤 宏 ..... 154

Removal of Transuranic Elements by DTPA  
O. Matsuoka and H. Sato

# I 放射線による発がんとその変更要因に関する 調査研究 概説

佐 渡 敏 彦 (生理病理研究部)

## Studies on Radiation Carcinogenesis : Its Modifying Factors and Mechanisms. A Review of the Past Five Years' Program

Toshihiko Sado  
Division of Physiology and Pathology

Studies were focused on the physical and biological factors that affect the incidence of radiation-induced tumors and on the cellular molecular mechanisms of radiation carcinogenesis .

Ohtsu and his group analyzed the effects of fast neutrons and  $\gamma$ -rays on the incidence of non-lethal tumors such as lung and liver tumors by serial sacrifice study for 3 different strains of mice, A/J, C3H/He and C57BL/6J. The results indicated that for all strains examined the time of the appearance of both types of tumors was not accelerated in the neutron treated mice as compared to that in the  $\gamma$ -ray treated animals, although the RBE values of neutrons as compared to  $\gamma$ -rays at peak incidence of tumors were approximately 5 for both tumors.

Sasaki conducted a series of experiments using several strains of mice to assess the effect of age at radiation exposure on the life-shortening and the tumor spectrum induced by radiations. In these studies, mice were exposed to 1.9, 3.8 and 5.7 Gy of  $\gamma$ -rays at several different ages ranging from prenatal period to 1 year of age. The results indicated that the ages between neonatal period to sexual maturity were the most sensitive for radiation-

induced life-shortening, which was mainly due to the development of tumors. He also showed that the age-dependency of the susceptibility of mice to radiation-induced tumors varied considerably depending on the tumor types, although the most susceptible period for all types of tumors occurred before the animals reached young adulthood. He also found that when phenobarbital, an well known tumor promoter, was given to a group of irradiated mice, a life-shortening which was normally observed in the exposed animals was significantly reduced.

Three groups participated in the studies of radiation-induced myeloid leukemias using two different strains of mice, C3H/He and RFM/Up. Seki and his group found that the incidence of myeloid leukemias induced after exposure to 47, 142 and 280 cGy of X-rays in C3H mice was significantly enhanced for all exposure doses, when mice were treated with prednisolone acetate shortly after radiation exposure. They also showed that experimentally induced inflammation as well as surgical stresses which were given shortly after radiation exposure significantly enhanced the leukemia incidence. This group also studied the kinetics of hemopoietic stem cells after such

treatments and presented a model to explain the mechanism of the enhancement of leukemia development.

Nakao and his group studied the single cell nature of the origin of thymic lymphomas induced in RFM mice by using X chromosome-linked PGK (phosphoglycerate kinase) isozyme markers, A and B, whose expression is regulated by random inactivation of one of the two X chromosomes in each somatic cell, and found that lymphomas of each animal had originated from a single cell. They also showed a dose-dependent increase in the incidence of myeloid leukemia and reduction of the latent period. In another experiment, they studied the effect of recombinant human interleukin 2 (rhIL-2), which is known to enhance the immunologic functions *in vivo* as well as *in vitro*, on the incidence of radiation-induced leukemia/lymphoma with a hope that such treatment might suppress the development of leukemia by enhanced immunological surveillance functions. The results indicated no evidence of suppression of leukemia development by such treatment. Rather, the time of the appearance of thymic lymphomas was accelerated, without influencing the final incidence.

Hayata and his group conducted cytogenetic studies of myeloid leukemia development in C3H mice. They showed that myeloid cells with deletion of C-D region of No.2 chromosome (2q-), which is a unique cytogenetic marker for murine myeloid leukemias, could be recovered as predominant clones in different individuals during preleukemic stage, indicating that the appearance of this specific chromosome marker is a necessary but not a sufficient step to fully develop into autonomous leukemias. This implies that radiation induced leukemias must develop after multi-step processes.

Muto and his group made a significant progress in their attempts to dissect the cellular events that take place during thymic lymphomagenesis induced by Kaplan's classical split-dose irradiation protocol in B10 strain mice. Major findings included the following :  
a) Thymocytes underwent abortive differentia-

tion in all split-dose irradiated mice, i. e., they rarely gave rise to functional killer precursor cells that could be induced to differentiate into effector killer cells by stimulation with appropriate alloantigens in the presence of IL-2 *in vitro*. b) Prelymphoma cells, which were already transformed but were dependent on thymic microenvironment to further develop into autochthonous lymphoma cells, could be demonstrated as early as one week after the last dose of split-dose irradiation, followed by a rapid increase in number during the next few weeks. Thus, at 3-4 weeks, more than 63% of the exposed mice were shown to contain prelymphoma cells in their thymuses. c) The number of pro T cells in the bone marrow of split-dose irradiated mice was greatly reduced so that regeneration of the thymus of the split-dose irradiated mice proceeded in the absence of recruitment of precursor cells from the bone marrow. d) Analysis of the expression of a variety of cellular oncogenes and T cell receptor (TCR) genes on thymus cells during thymic lymphomagenesis indicated that expression of c-myc and TCR $\gamma$  genes was greatly enhanced, while other oncogenes and TCR $\alpha$ ,  $\beta$  genes were poorly expressed.

Shikita and his group purified human macrophage growth factor (M-CSF) and mouse granulocyte-macrophage growth factor (GM-CSF), and determined the amino acid composition and the N-terminal amino acid sequence of these factors. With the use of these purified preparations, they examined the effects of these hematopoietic growth factors on the proliferation and function of normal myeloid cells as well as radiation-induced mouse leukemic cells. They also cloned several fibrosarcoma cell lines that secrete both M-CSF and G-CSF. By using these cell lines they attempted to purify murine M-CSF and G-CSF for further molecular analysis.

Hori and his group conducted a population cytogenetic study of 1022 healthy subjects and 547 cancer patients to determine baseline frequencies of rare autosomal fragile sites that have been implicated as the site(s) of human

genome predisposing to chromosome instability and a variety of clinical manifestations including cancers. They found, in addition to already known six out of 17 rare autosomal fragile sites, three novel ones that appear to be unique for Japanese population. They also studied the mechanism of the expression of fragile X

発がん研究グループでは、放射線による発がんの変更要因の解析と発がん機構の細胞分子生物学的解明をその目標として研究を進めた。

発がんの変更要因については、特に線質の影響及び被曝時年齢と腫瘍発生スペクトラムとの関係に注目した。発がんのメカニズムに関しては、放射線発がんにて特に重要な位置を占める骨髄性白血病及びリンパ性白血病に焦点を合わせて解析を進めた。白血病発生過程で重要な役割を果たすと考えられる造血統御因子の分離精製も行われた。また、ヒトの発がん高感受性要因の1つとして、最近特に注目されている染色体の遺伝性脆弱部位の検出法の開発と population survey を行った。以下に、これらの知見を要約する。

線質効果に関しては、ガンマ線及び中性子線照射群及び対照群の C3H, C57BL, A/J 系マウスを経時的に殺して、マウスにとって致命的でない腫瘍と考えられる肺腫瘍及び肝腫瘍の発生時期及び発生率に及ぼす影響を調べた。この実験により、肺腫瘍の発生時期については、ガンマ線照射群に比して、速中性子線照射群の方が早くなるということではなく、何れの場合も対照群に比して有意の増加が認められるのは12カ月以降で、18-21カ月でピークあるいはプラトーに達することが分かった。また、線量反応関係については、ガンマ線照射群では1-5Gyの範囲で腫瘍発生率は線量依存性に増加したが、中性子線照射群では1Gyをピークとして、線量の増加と共に低下した。中性子線のRBEは約5と算定された。肝腫瘍についても、発生時期はガンマ線と中性子線とで差はなかった。線量反応関係については、ガンマ線では線量依存性に増加したが、中性子線では1-3Gyで差がなく、RBEは約5と算定された。

次に、被曝時年齢と寿命短縮及び腫瘍発生スペクトラムとの関係については、胎児期から365日令までの種々の年齢で一定線量(3.8Gy)のガンマ線を照射した幾つかの系統のマウスについて寿命短縮及びそれらのマウスに発生した腫瘍の種類とその発生率を調べた。その結果、マウスの出生

syndrome by using human-mouse somatic cell hybrids. From these studies, they speculated that fragile site X mutation arose from chromosomal change in a special class of replicons with polypurine/polypyrimidine DNA sequence.

から性成熟までの期間が寿命短縮に関して最も感受性が高いことが分かった。これは主として腫瘍の発生によるものである。また、それぞれの腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性は腫瘍の種類によりそれぞれ異なるが、誘発に関する感受性がピークとなる時期は全ての種類の腫瘍について若い成体期以前であることが分かった。胎児期後期の被曝で6種類の腫瘍(リンパ球型リンパ腫、下垂体腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、骨腫瘍)が誘発されたが、それらの腫瘍が全て成体型のものであったことも注目される。

系統間あるいは種間差異については、自然発生率がやや高い系統や動物種の方が、放射線による誘発に関しても感受性が高い傾向が認められた。これはヒトの放射線発がんのリスクを推定する場合に、ヒトのがんの自然発生率についての疫学的調査研究が重要な意味を持っていることを強く示唆している。

このグループでは、放射線照射マウスに発がんプロモーターのフェノバルビタールを投与した場合の影響も調べたが、この実験ではガンマ線による寿命短縮効果は、フェノバルビタール投与により抑制されるという意外な結果が得られた。その理由はよく分からない。

骨髄性白血病については、3つのグループにより、2つの異なった系統のマウス(C3H, RFM)を用いて研究された。C3Hマウスを用いたグループは、放射線によって誘発される骨髄性白血病の発生率に及ぼす副腎皮質ホルモン投与及び炎症あるいは傷害ストレスの影響を調べ、興味ある知見を得た。

まず、骨髄性白血病の発生率は47, 142, 280 cGyの照射では線量依存性に増加したが、さらに線量を上げると白血病発生率はむしろ低下した。これは、RFMあるいはCBA系統のマウスについて他の研究者によって報告されている結果と一致する。本研究で特に注目されたことは、放射線被曝直後に合成副腎皮質ホルモンであるプレドニゾンアセテートを投与した場合には、47,

142, 284 cGy 照射群の全てについて、照射単独群に比して、骨髄性白血病の発生率が有意に上昇したことである。また、実験的に誘導された炎症反応や外科的ストレスも放射線による骨髄性白血病の発生を高める効果があることが明らかになった。

副腎皮質ホルモンあるいはストレスによる放射線誘発白血病発症の機序についても実験血液学的な検討を進め、幹細胞動態を考慮したモデルを提出したが、その検証は今後の課題である。このグループでは、また、放射線で誘発された幾つかの白血病細胞クローンの性状について、造血因子依存性を含めた実験血液学的検討を行い、白血病の発症あるいは進展の機構を考える上で興味ある知見を得ている。

一方、RFM マウスを使った中尾グループでは、a) 放射線によって誘発される胸腺リンパ腫の標的細胞の起源（多細胞起源か単一細胞起源か）、b) 放射線誘発白血病及び胸腺リンパ腫の発生率と潜伏期の線量依存性、c) 放射線誘発白血病の発生率に及ぼす造血統御因子あるいは免疫統御因子（インターロイキン 2）の影響を調べた。

まず、胸腺リンパ腫の起源については、X 染色体上の PGK(phosphoglycerate kinase)A, B の isozyme マーカー（これらは 1 対の対立遺伝子によってコードされている）が、雌マウスでは X 染色体の一方がランダムに不活化されているために、個々の細胞のレベルではいずれか一方の染色体上の遺伝子だけが発現されていることを利用して、PGK-A/B ヘテロの C3H マウスに 1.70 Gyx 4 回照射により誘発された胸腺リンパ腫について、PGK-A/B isozyme の発現を調べ、それらの全てが、A, B いずれか一方のみを発現していること、即ち胸腺リンパ腫が単一細胞起源であることを確認した。次に、RFM 系マウスの放射線誘発骨髄性白血病の発生率は、0.5, 1.0, 1.5, 3.0Gy 照射群について線量依存性に増大し、潜伏期間は線量依存性に短縮することを確認した。また、胸腺リンパ腫については、1.5Gy 以上の照射で有意に増加し、潜伏期間も線量依存性に短縮することを認めた。

次に、幾種類かの予備実験の結果に基づいて、放射線誘発白血病の発症率を低下させる可能性を期待して、X 線照射後インターロイキン 2 を投与する実験を行った。その結果、骨髄性白血病の発生率は影響を受けなかったが、胸腺リンパ腫については、潜伏期が短縮する傾向を認めた。

早田グループは、主として細胞遺伝学的な立場から白血病の研究を進めた。このグループは、前特別研究期間中に、C3H 及び RFM 系マウスに放射線で誘発される骨髄性白血病には、ヒトの慢性骨髄性白血病に特異的な細胞遺伝学的マーカーである Ph1 染色体に匹敵する特異な染色体異常——第 2 染色体の C, D 領域の欠失 (2q-)——を伴うことを明らかにした。そこで、本特別研究では、マウスの骨髄性白血病における 2q- 異常の意義の解明を目的として実験を計画した。検討された項目は、a) 2q- 異常の出現時期、b) 白血病発症以前に検出された 2q- 異常細胞の造腫瘍性、c) 異なる照射条件で照射された造血組織の細胞遺伝学的研究、d) 骨髄性白血病細胞におけるがん遺伝子の解析、e) 新しい造血細胞腫瘍の細胞遺伝学的研究、f) 骨髄性白血病の染色体異常の比較解析である。

これまでの研究で、放射線誘発骨髄性白血病に特徴的に認められた 2q- 異常細胞は、放射線被曝後比較的早期に、白血病発症に先立って出現するが、これらの細胞を他の個体に移植しても造腫瘍性を示さないということが明らかになった。この結果は、2q- の出現は白血病発症の必要条件ではあるが、充分条件ではないことを示し、白血病発症には 2q- の出現の他に、さらにもう一つあるいはそれ以上のステップが必要であることを意味している。即ち、白血病発症の過程は多段階的に進行すると考えられる。また、骨髄性白血病の 2q- とがん遺伝子との関係については、幾つかの白血病細胞から得られた DNA を幾種類かの制限酵素で分解後、V-ab1 をプローブとして予備的な解析を行ったが、まだ結論的な結果を得るには至っていない。次に、C3H 系マウスに骨髄性白血病好発条件 (3Gy 全身 1 回照射) 及び胸腺リンパ腫好発条件 (1.7Gy 1 週間おき 4 回全身照射) で、X 線照射後、経時的に染色体異常を比較したところ、両者の間で誘発される染色体異常をもった細胞クローンの数や異常染色体の型に差があることが明らかになった。

武藤グループは、前特別研究期間中に佐渡らによって育成された B10.Thy 1 コンゼニックマウスを用いて、放射線の間接作用による胸腺リンパ腫誘発に関する Kaplan の古典的研究を再確認していたが、本特別研究では、それらの知見を踏まえて、胸腺リンパ腫の発生機序を明らかにすることを最終の目的として実験を計画した。

研究のストラテジーとしては、X 線分割照射

(1.61Gy $\times$ 4) による胸腺リンパ腫発生過程における、a) 胸腺細胞の分化異常の実体の把握、b) 前リンパ腫細胞及び自律性リンパ腫細胞の発生時期とその部位、c) 骨髄中の前T細胞の定量、d) 胸腺リンパ腫発生における骨髄由来細胞の役割、e) 胸腺リンパ腫発生の分子生物学的解析を当面の課題とした。これらの研究と並行して、他の研究機関の研究者と協同して、B10.Thy 1 コンゼニックマウスを用いて、T細胞系列の細胞の分化成熟過程を解析するための実験系の開発を行った。これが本研究グループの研究の進展に大いに役だった。

これまでの研究で明らかになった重要な点は、X線4分割照射されたマウスの胸腺では、T細胞の分化は正常に進行しないこと、前リンパ腫細胞は分割照射後かなり早くから胸腺内に生ずること、分割照射マウスの骨髄では、T細胞の前駆細胞であるプレT細胞が著しく減少していること、及び胸腺リンパ腫発生における照射骨髄の役割は、プレT細胞の枯渇によって、胸腺細胞の分化異常を引き起こすことにあると考えられることである。

色田グループは、白血病の発生と進展に重要な役割を果たすと考えられる、骨髄系の未分化細胞の増殖分化を統御する細胞増殖因子 (CSF : colony stimulating factor) についての生化学的研究を進めると共に、各種 CSF の生物活性を調べた。先ず、ヒト及びマウス材料から得られた幼若マクロファージ増殖因子 (M-CSF)、幼若好中球増殖因子 (G-CSF) 及びマクロファージにも好中球にも分化しうる二分化能を持つ白血球前駆細胞 (CFU-GM) の増殖因子 (GM-CSF) を純化し、アミノ酸組成及びN末端のアミノ酸配列

を決定した。次に、これらの精製 M-CSF 及び GM-CSF を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* における骨髄系細胞や放射線誘発白血病細胞に対する増殖あるいは機能促進効果を調べた。また、M-CSF の受容体と考えられる *c-fms* がん遺伝子の発現と各種放射線誘発白血病株の発現量及び mRNA の分子サイズを分子生物学的に検索した。

最後に、堀グループは、ヒトの遺伝性発がん高リスク要因の一つと考えられる染色体の遺伝性脆弱部位 fragile site (FS) の検出法の開発とそれらの方法を用いた遺伝性 FS 保因者の検索及び FS の発現機構の解析を行った。過去、数年間にわたる調査研究の結果、一般健常人1022人と癌患者547人について FS 検査を行った結果、三つの異なった方法で検出される3群9種類の FS 保因者を検出することができ、一般健常人群の FS 保因者の頻度は全部で5.1%で、FS の種類によってその頻度が異なることが分かった。これらのうち3種類は本研究においてはじめて見出されたもので、日本人特有のものである可能性が高いと考えられた。また、癌患者群の調査では、FS 保因者の全体的頻度が一般健常人と有意差はなかったが、患者別の考察及び腫瘍細胞の染色体再配列の解析結果から、遺伝性 FS が腫瘍発生に直接的あるいは間接的に関与している可能性を示唆する結果が得られた。遺伝性 FS の発現機構の解析からは、それが正常な染色体上の特定の高遺伝子組換え領域に生じたマクロな染色体レベルの突然変異であることが示唆された。

全体として、各グループともに研究の着実な進展が認められ、問題点がかなり明確になってきたと考えられる。

# 1. 放射線発がんに及ぼす線質の影響

(特に速中性子線による)

大津 裕司, 古瀬 健, 野田 攸子, 小林 森

(生理病理研究部)

丸山 隆司 (物理研究部)

佐藤 文昭 (北海道大学・獣医学部)

## Serial Sacrifice Study on Tumorigenesis in Male C57BL/6J Mice Exposed to Gamma-Ray or Fast Neutron Radiation

Hiroshi Otsu, Takeshi Furuse, Yuko Noda, Shigeru Kobayashi

Takashi Maruyama<sup>\*1</sup> and Fumiaki Sato<sup>\*2</sup>

Division of Physiology and Pathology, <sup>\*1</sup>Division of Physics,

<sup>\*2</sup>Hokkaido University, Veterinary School

In this serial sacrifice study, we investigated the relationship between the incidence and time of the appearance of neoplasms in male specific pathogen-free C57BL/6J mice at 4 weeks of age, exposed to gamma-ray radiation from Cs-137 in graded doses of 1 to 5 Gy at a dose rate of 1 Gy/min or fast neutron radiation from a van de Graaff accelerator in doses of 1 to 3 Gy at a dose rate of 0.067 Gy/min.

Radiation-induced lung tumor and liver tumor were more frequent than other types in most groups, and the incidence of both kinds of tumors was found to be high enough to warrant an investigation of the dose responsiveness for tumorigenesis. These tumors began to appear 12 months after irradiation, and reached a maximum incidence in most groups 21 or 24 months after irradiation. In gamma-ray irradiated

mice, lung tumor developed in a dose dependent manner, as did liver tumor, and in neutron irradiated mice, liver tumor grew 2.5 to 4.8 times more frequently than lung tumor, more significantly than in control mice, but any dose response relationship for lung tumor and liver tumor was obscure. In a comparison of the tumor incidence of the two different radiations, lung tumor incidence in 1 Gy neutron irradiated mice corresponded to the incidence in 5 Gy gamma-ray irradiated mice, and liver tumor incidence was 2 to 4 times higher in mice irradiated by neutrons than in those by gamma-rays at the same doses. Consequently, the relative biological effectiveness was calculated about 5.

Key-words : tumorigenesis, fast neutron, gamma-ray radiation, relative biological effectiveness (RBE)

### 1. 緒言

放射線被曝後、晩期になって惹起される障害のうち、発がんは寿命の短縮は大きな問題であり、

その事象を詳細に検討した研究の多くは、寿命に主眼を置いた終生実験によって行なわれている。発生した腫瘍のうちでも骨髄性白血病や胸腺リンパ腫のような実験動物にあっても致命的な疾病で

は、死因とがん発生とが密接な関係にあり、がんに関かわる発生率、発生時期（または、がんの潜伏期）そして、発生率の経時的変化などの事象を比較的適格に把握できる。しかし、実験動物では直接死因とはなり難い肺や肝の腫瘍は、たまたま他の原因で死亡した動物の剖検時に発見されるにすぎず（偶発性腫瘍と云われる）、腫瘍の発生時期とその経時的変化の詳細な検索は困難である。本実験ではこの点に留意して、経時的に屠殺検索を行なって、これら偶発性腫瘍の発生様式を明らかにしようとした。また腫瘍発生様式の線量および線質（ $\gamma$ 線と速中性子線）とによる相違を検討した。

## 2. 研究方法

照射実験には当所で生産された特異的病原体のない（specific pathogen-free : SPF）C57BL/6J雄マウスを4週令で使用した。

速中性子線照射実験にはバンデグラフ加速器からの平均エネルギー 2MeV の速中性子線を、線量率 0.067Gy/分 でマウスの全身に照射した。

$\gamma$ 線照射実験には Cs-137 線源からの $\gamma$ 線を、線量率 1Gy/分 でマウスの全身に照射した。

照射線量は速中性子線は 1Gy, 2Gy, 3Gy の3線量群（NG-1G 群、NG-2Gy 群、NG-3Gy 群）で、 $\gamma$ 線は 1Gy から 1Gy ごとに 5Gy までの5線量群（GR-1Gy 群… GR-5Gy 群）とした。なお対照群として照射をしない無処置群をもうけた。照射法は照射用特製のアクリル樹脂製円盤状容器（直径12.3cm、厚さ3.0cm）で、さらに隔壁

によって6等分に区分けされた小室内に1匹づつマウスを入れ、SPF 条件下で照射された。照射後、マウスは SPF 条件下で飼育された。

検索は照射後4ヶ月そして6ヶ月以降24ヶ月までの間は3ヶ月ごとにそれぞれ頸椎脱臼屠殺後、剖検、主要臓器を採取、10%ホルマリンで固定後、通常に行なわれている方法で顕微鏡標本を作成して検索した。また、死亡マウスも発見後、屠殺マウスに準じた方法で検索した。各群の屠殺検索匹数は $\gamma$ 線照射群ではほぼ45～55匹であるが、速中性子線照射群では検索匹数が不揃のため表内に検索数を記載した。

## 3. 結 果

速中性子線被曝マウス群について

肺腫瘍は粟粒大から帽針頭大で、1～数個の腫瘤を形成し、腫瘤はエオジンに好染する円柱状細胞からなる腺管状構造または乳頭状構造を呈した上皮系の発育をした腺腫であった。

肺腫瘍（表1）は対照群も含めて被曝後9ヶ月ぐらいまでは散発的であるが、被曝12ヶ月で発生率が増加しはじめ、被曝後18ヶ月では各線量群とも10%台で有意の増加（NG-1Gy 群：18.0%、NG-2Gy 群：14.3%、NG-3Gy 群：17.7%）し、被曝後21ヶ月、24ヶ月でも同様な発生状態を示している。

肝腫瘍は小豆大から拇指頭大までで、1～6個の腫瘤を形成している。腫瘤は正常肝細胞よりやや大形の細胞が索状に配列して、僅かな毛細血管が基質となり腫瘍を構成している、所謂、ヘパ

表1. バンデグラフ速中性子線照射による肺腫瘍発生率

線 量 (Gy)	被 曝 後 の 月 数							
	4	6	9	12	15	18	21	24
0	1/55* ( 1.8)**	1/53 ( 1.9)	0/61 ( 0 )	1/55 ( 1.8)	2/52 ( 3.8)	1/48 ( 2.1)	3/58 ( 5.2)	5/57 ( 8.8)
1	1/24 ( 4.2)	0/19 ( 0 )	1/12 ( 8.3)	4/62 ( 6.5)	0/29 ( 0 )	9/50 (18.0)	17/57 (29.8)	15/54 (27.8)
2	0/43 ( 0 )	2/22 ( 9.1)	0/21 ( 0 )	5/69 ( 7.3)	3/30 (10.0)	6/42 (14.3)	6/55 (10.9)	6/37 (16.2)
3	0/43 ( 0 )	0/37 ( 0 )	1/30 ( 3.3)	1/88 ( 1.1)	2/51 ( 3.9)	9/51 (17.7)	7/40 (17.5)	3/28 (10.7)

\* 肺腫瘍を持っていたマウス数/剖検マウス数

\*\* 発生率：パーセント

表2. バンデグラフ速中性子線照射による肝腫瘍発生率

線 量 (Gy)	被 曝 後 の 月 数							
	4	6	9	12	15	18	21	24
0	0/55* ( 0 )**	0/53 ( 0 )	0/61 ( 0 )	0/55 ( 0 )	0/52 ( 0 )	4/48 ( 8.3)	2/58 ( 3.4)	3/57 ( 5.3)
1	0/24 ( 0 )	0/19 ( 0 )	4/12 (33.3)	5/62 ( 8.1)	8/29 (27.1)	29/50 (58.0)	38/57 (66.7)	35/54 (64.8)
2	0/47 ( 0 )	0/25 ( 0 )	1/21 ( 4.8)	16/69 (23.2)	9/30 (30.0)	22/42 (52.4)	34/55 (61.8)	30/37 (81.1)
3	1/43 ( 2.3)	1/37 ( 2.7)	1/30 ( 3.3)	18/88 (20.5)	19/51 (37.3)	24/51 (47.1)	20/40 (50.0)	22/28 (78.6)

\* 肝腫瘍を持っていたマウス数/剖検マウス数

\*\* 発生率：パーセント

トーマであった。

肝腫瘍(表2)はNG-3Gy群では被曝後4ヶ月から発生がみられたが、被曝12ヶ月で3群とも発生率の増加傾向が明らかになり、被曝後15ヶ月では実験群の肝腫瘍発生率はほぼ30%となり、被曝後18, 21, 24ヶ月とその発生率の増加傾向がみられた。対照群は18ヶ月以降でも10%以下の発生率であるのと対照的であった。

$\gamma$ 線被曝マウス群について

肺腫瘍は組織学的には速中性子線被曝マウスに発生した肺腫瘍と相違はなかった。肺腫瘍の発生(表3)は被曝後の散発的発生から被曝後12ヶ月から各被曝群とも漸増し、15ヶ月では5Gy照射群と2Gy照射群に14.0%と17.3%の有意の増加がみられ、以後18ヶ月では4Gyと5Gyの照射

群(GR-4Gy群:19.2%, GR-5Gy群:13.5%)に、被曝21ヶ月後には3Gy, 4Gyと5Gyの照射群に有意の増加が認められた。特に被曝21ヶ月後では線量に比例して0Gyから5Gyまでの各群の肺腫瘍発生率は対照群の5.2%から5Gy照射群(GR-5Gy群)の23.6%と増加し、相関性が認められた。

肝腫瘍は肺腫瘍と同様に組織学的に速中性子線被曝マウスに発生した肝腫瘍とは相違は認められず、ヘパトーマであった。実験群の肝腫瘍発生率(表4)は被曝12~15ヶ月から増加し、同18ヶ月では4Gyと5Gyの照射群(GR-4Gy:25.0%, GR-5Gy:43.2%)で有意の増加があり、さらに、1Gy照射群から5Gy照射群までの発生率の増加は比例関係があり、肝腫瘍発生の線量依存

表3.  $\gamma$ 線照射による肺腫瘍発生率(Cs-137)

(Gy)	被 曝 後 の 月 数							
	4	6	9	12	15	18	21	24
0	1.8	1.9	0	1.8	3.8	2.1	5.2	8.8
1	0	0	1.9	8.8	9.6	5.4	9.1	12.1
2	0	0	2.1	4.0	17.3	2.0	9.6	-
3	4.0	4.0	10.3	8.9	8.5	6.8	20.3	26.9
4	-	0	2.4	4.3	12.5	19.2	19.4	-
5	2.2	3.6	3.9	11.3	14.0	13.5	23.6	23.5

表4.  $\gamma$ 線照射による肝腫瘍発生率 (Cs-137)

(Gy)	被 曝 後 の 月 数							
	4	6	9	12	15	18	21	24
0	0	0	0	0	0	8.3	3.4	5.3
1	-	0	0	0	3.2	8.1	0	9.1
2	-	0	2.1	0	13.5	15.7	30.8	-
3	0	0	0	0	6.8	22.7	5.1	23.1
4	-	0	7.3	6.4	20.0	25.0	32.3	-
5	0	0	0	1.9	8.8	43.2	21.8	27.1

性が認められた。次の21ヶ月では2Gy照射群の発生率が有意に増加し、ほぼ被曝線量が高い群ほど早期に腫瘍発生が高率になる傾向が認められた。

#### 4. 討 論

速中性子線照射による肺腫瘍発生率は実験条件により多少の相違はあるが、自然肺腫瘍発生率の低発系マウスを用いた場合にはほぼ20%前後の発生率である。この実験で用いたマウスは表1にあるように10%以下の肺腫瘍自然発生率の低い系であり、速中性子線照射により照射後18ヶ月で初めて有意の増加がみられ、肺腫瘍発生時期が早められることはなかった。その後、各線量群には、10～30%の間で肺腫瘍発生率の増減があり、肺腫瘍発生の速中性子線被曝による線量依存性の相関性は明瞭ではなかった。ただ2Gyや3Gyの高い被曝群より1Gyの被曝群の方が高い肺腫瘍発生率を示しており、この結果から1Gyの近傍にベンデグラフ速中性子線による肺腫瘍誘発至適線量があることが推測され、1Gyより低い線量との間に肺腫瘍発生率と線量との依存性が存在することが推定された。 $\gamma$ 線被曝群では被曝後21ヶ月に肺腫瘍発生と被曝線量との間に比例関係が成りたっており、5Gy被曝群で23.6%と同時期で最も高い発生率を示していた。この値は速中性子線1Gyを照射された群の同時期の値29.8%と近似しており、肺腫瘍発生率からは生物学効果比はほぼ5と算定された。

肝腫瘍発生は速中性子線照射実験ではあまり注目されておらず、 $\gamma$ 線照射実験では発生が誘発されるが、とくに、肝腫瘍の自然発生率の高い系のマウスに誘発されると報告されている。本実験の

$\gamma$ 線照射群では被曝後18ヶ月で有意に肝腫瘍発生率が増加し、発生と線量との間に相関が認められた。速中性子線被曝群では被曝後12ヶ月から肝腫瘍発生率が増加し、被曝18ヶ月以降ではその発生率は45%から80%と高率で、肝腫瘍自然発生好発系マウス、例えばC3H系マウスの照射誘発結果に近い発生率が認められた。肝腫瘍発生率は被曝後15ヶ月ではほぼ線量に依存した増加を示したが、18と21ヶ月では逆に1Gy被曝群が最も高率となり、24ヶ月では2Gy被曝が高率を示した。このように、肝腫瘍発生は線量依存性に乏しい結果を示した。そして、3線量群間に肝腫瘍発生率の相違は認められず、肺腫瘍の発生率と同様1Gy以下の被曝線量の範囲に線量依存性が観察される可能性が示唆された。肝腫瘍発生率について同一線量の同一時期の速中性子線被曝群と $\gamma$ 線被曝群の間で被曝後18～24ヶ月の期間の実験値を比較すると、1Gy群では7、2Gy群では2～3、3Gy群では2～10の間の比率を示し、速中性子線照射が肝腫瘍を誘発する力が $\gamma$ 線より強いこと示した。

これまでの結果から速中性子線被曝群では肺腫瘍発生より肝腫瘍発生の方が高頻度に惹起されることが明らかとなった。この事実は被曝後18ヶ月以降の各々の実験群の値の和から、各線量の肝腫瘍発生率に対する肺腫瘍発生率の比率を求めると、速中性子線1Gy被曝群(NG-1Gy群)では2.5(NG-2Gy群)では4.8(NG-3Gy群)では3.5となり、肝腫瘍発生が少なくとも肺腫瘍の2倍の高率に発生していることを表現している。一方、 $\gamma$ 線被曝群ではその比率は1Gy被曝群の0.60から始まって、以下、1.60, 0.86, 1.18とそして

5Gy 被曝群の1.37で、平均1.1で標準偏差が0.3となり、肝腫瘍と肺腫瘍の発生率はほぼ等しく、この結果は、線質の異なることにより、惹起される腫瘍の発生率に相違が出てくることを示している。線質により、異なった腫瘍がより高率に誘発されるとすれば、速中性子線は肝腫瘍発生率ほど高率でないが、他の腫瘍を誘発する可能性があるので今後広く腫瘍の検索をすすめて、腫瘍のスペクトルおよび腫瘍の多重性と線質効果との相関性を追求してゆきたい。

## 5. 結 論

(1) 肺腫瘍発生は速中性子線照射により、 $\gamma$ 線照射以上には早期に促進されることはなかった。

(2) 肺腫瘍発生率は1~3Gyの範囲の速中性子線照射では1Gy照射が最も高率(29.8%)であった。また有意の肺腫瘍発生時期は $\gamma$ 線照射と同様照射後18ヶ月以降であった。

(3) 速中性子線照射により肝腫瘍が肺腫瘍より高率(60~80%)に発生し、発生時期はほぼ同時期であった。

(4) 速中性子線照射による1~3Gyの範囲では肝腫瘍発生率は線量間で有意の相違はみられなかった。

(5)  $\gamma$ 線照射では肺腫瘍は照射後12ヶ月で発生がみられ、同21ヶ月で有意の増加とともに線量と発生率との間に依存性が認められた。

(6) 速中性子線1Gy照射後21ヶ月の肺腫瘍発生率は29.8%で、この値に相当する $\gamma$ 線の照射実験群の値は5Gy照射後21ヶ月の実験群の値でその発生率は23.6%であり、RBEはほぼ5と算出された。

(7) 肝腫瘍発生率からのRBEの算定は速中性子線1Gy照射後18ヶ月の発生率58.3%と $\gamma$ 線5Gy照射後18ヶ月値の43.2%とがほぼ相当するとすれば肺腫瘍発生率からと同様ほぼ5であった。

## 〔研究発表〕

- 1) 野田攸子、古瀬 健、小林 森、大津裕司：放射線照射のマウス脂肪組織重量への影響。第35回日本実験動物学会，講演要旨集，**113**, 1988.5 (金沢)。
- 2) 大津裕司，古瀬 健：バンデグラフ速中性子線照射による肺腫瘍発生。第77回日本病理学会総会，日本病理学会誌77 (補冊)，**140**, 1988.5 (札幌)。

## 〔謝 辞〕

本実験の遂行にあたり、動物の供給、管理に御協力をいただいた動植課の諸氏、バンデグラフ速中性子線照射に御盡力いただいた技術課の村越氏および日々動物の飼育観察の労をとって下さった土橋、篠原、根本、尾崎の諸氏に御礼申し上げます。

## 2. 放射線による腫瘍発生スペクトラムの変化に及ぼす

### 生物学的要因の影響に関する研究

佐々木 俊 作 (生理病理研究部)

## Influence of Biological Variables on Radiation Carcinogenesis

Shunsaku Sasaki  
Division of Physiology and Pathology

1. Age at exposure : Female B6C3F<sub>1</sub> mice were irradiated at day 17 of the prenatal age, or day 0, 7, 35, 105, 240 or 365 of the postnatal age with 1.9, 3.8 or 5.7 Gy of gamma-rays from <sup>137</sup>Cs. All mice were allowed to live through their entire life span under a specific pathogen free condition. It has become evident that mice of the late fetal period have susceptibility to induction of pituitary tumors, bone tumors, liver tumors, lung tumors, lymphocytic lymphomas and ovarian tumors. Neonatal mice were found to be more susceptible to induction of lymphocytic lymphomas, liver tumors and ovarian tumors than fetal mice. Irradiation of fetal or neonatal mice did not result in the excess development of myeloid

leukemias and Harderian gland tumors, whereas these neoplasms were induced by irradiation at the adult period.

2. Combination effects of radiation and chemicals : Both sexes of B6WF<sub>1</sub> mice were exposed to X-rays at day 5 of postnatal age. After weaning, pellet diet containing 0.05% phenobarbital was given until their natural death. It was rather surprising that life-shortening effect of X-irradiation was decreased by oral administration of phenobarbital. This effect seemed to be due to delayed development of neoplastic diseases. Administration of phenobarbital did not result in decrease in incidences of neoplasms.

### 1. 緒 言

放射線被曝の生涯リスクを把握するための最も強力な方法は終生飼育法である。実験動物を良好な環境で自然死まで飼育するとかなり高い頻度で腫瘍の発生が認められる。放射線を照射すると、腫瘍の種類別頻度と発生時期が非照射群とは異なるものとなる。すなわち、腫瘍発生スペクトラムが変化する。本研究においては一貫して終生飼育法を用いていることが特徴である。

このような研究方法により解析の対象とした問題は、放射線発がんによらず生物学的要因の影響である。研究内容の概略は次の通りである。

a. 被曝年齢 : マウスの胎児期から365日齢までの各種の腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性を調べた。胎児期被曝により腫瘍が誘発されるかどうかを再検討することに重点を置いた。

b. 放射線照射後の化学物質連続投与の影響 : マウスの新生児期に照射し、離乳後フェノバルビタールを経口投与する実験を行った。フェノバルビタールは発がん物質による肝腫瘍誘発をプロモートすることが知られているものである。今回の実験では、意外にも放射線による寿命短縮効果を低減する作用があることが明らかとなった。

c. 系統差と種間差 : 5系統のマウスの各種腫瘍の自然発生率と新生児期放射線照射後の発生率

を調べた。マウスとラットの新生児期照射による肝腫瘍誘発に関する感受性に大差があることに着目し、腫瘍前駆細胞集団である可能性のある酵素変異細胞集団の消長を測定した。

これらのうち被曝時年齢の影響について最も重点を置いて研究を進めた。従ってこの報告においても感受性の年齢差についての記述に重点を置く。

## 2. 研究方法

サブテーマのそれぞれについて研究方法を記す。

a. 被曝時年齢：B6C3F<sub>1</sub> 雌マウスの胎生17日齢、出生後0、35または105日齢に<sup>137</sup>Csの $\gamma$ 線を1.9、3.8または5.7Gy照射した。また、7、240または365日齢に3.8Gyを照射した。動物数は対照群198、照射群の大部分は80から90の間である。この他にB10系マウスを用いる補助的実験を行った。B10系雌マウス（一群当たり約60）を胎生18日齢または出生後0日齢に $\gamma$ 線を3.8Gy照射した。これらのマウスはSPF条件下で終生飼育した。高圧滅菌したMB-1飼料（船橋農場製）とpH2.8-3.0に調整した飲料水を与えた。死亡し

たマウスは中性等張10%ホルマリン溶液で固定し、その後に剖検した。剖検所見は写真に記録した。全ての腫瘍および主な臓器は組織標本を作製して検討した。寿命短縮効果は平均寿命の他に年齢別死亡率により表現した。腫瘍誘発効果は発生率（incidence）とその腫瘍による年齢別死亡率により表現した。また、いわゆる死因の競合を補正するためのいくつかの方法を用いて計算した。しかしこの報告の中で示す数値は発生率のみである。

b. 放射線照射後の化学物質連続投与の影響：雌雄のB6WF<sub>1</sub>マウス、すなわちC57BL/6JNrsとWHT/Htの雑種第一代、を用いた。出生後5日齢に200kVpのX線を1.89または3.78Gy照射した。離乳後フェノバルビタール（PB）を0.05%に含むMB-1飼料を自然死まで与えた。対照としてPBを含まない飼料を与えたグループを設けた。動物数は一群約80である。ただし非照射無処置群は数が多く230である。全てのマウスは終生飼育された。剖検、組織学的検討およびデータ解析の方法は上述と同じである。

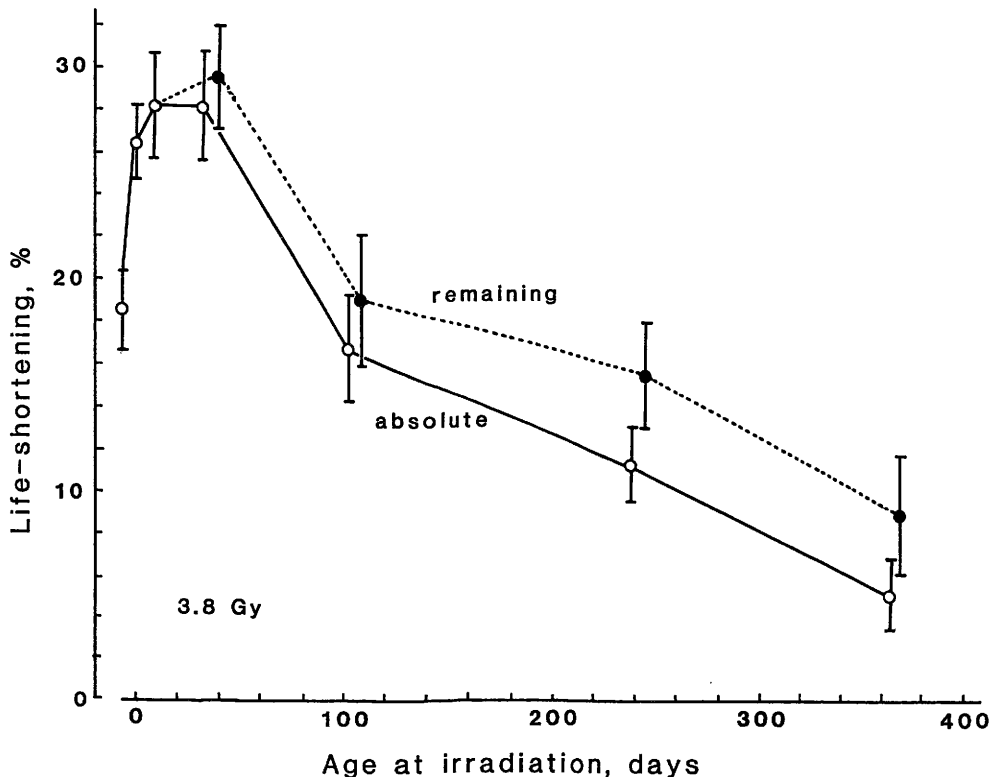


図1. 寿命短縮に関する感受性の年齢依存性。B6C3F<sub>1</sub> 雌マウスの胎生17日齢、出生後0、7、35、105、240または365日齢にガンマ線を3.8Gy照射した。縦軸は短縮率。

c. 系統差と種間差: C57BL/6JNrs, C3H/HeNrs, B6C3F<sub>1</sub>, B10/SnNrs および B10BR/SnNrs の5種類のマウスについて系統差を調べた。出生後0日齢に $\gamma$ 線を3.8Gy照射した。動物数は一群50ないし85である。ただし B6C3F<sub>1</sub> の対照群は198である。

Wistar 系ラットの8日齢または20日齢にX線を0.5、1.0または4.0Gy照射し、22週齢において肝臓の凍結切片を作製して酵素変異細胞集団を計数した。対象とした酵素は細胞膜結合性 adenosine triphosphatase (ATPase),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GTPase), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6Pase) 等である。同じ線量を照射されたラットを長期間飼育した。当初は終生飼育を予定したが、HVJ感染が起こったので約一年半で打ち切った。なおラットを用いた実験は癌研究所病理部の北川知行氏との協同研究である。

### 3. 結果

#### a. 被曝時年齢

図1は $\gamma$ 線3.8Gy照射後の寿命短縮率を照射時の日齢に対してプロットしたものである。対照

群の平均寿命は869日であった。この図では平均寿命の短縮と照射時からの平均余命の短縮の両方を示した。出生後0、7および35日齢の照射が最も大きな寿命短縮効果があることが分かる。マウスは40日齢前後に性成熟に達するので、寿命短縮に関して最も感受性の高い時期は出生から性成熟までの期間ということになる。マウスの骨成長は約100日齢まで続くので、105日齢は若い成体期である。成体期は幼若期に比べて感受性は低いといえる。成体期を通じて一定の感受性を持つのではなく、年齢が進むにつれて低下して行く。365日齢のマウスは新生児期に比べるとはるかに低い感受性である。B6C3F<sub>1</sub> マウスの平均寿命は869日であるから、365日齢は高齢ではない。胎生17日齢は出生の2日前である。出生を境にして感受性が大きく変化することが明らかである。新生児期の方がはるかに感受性が高い。胎生17日齢の照射は105日齢の照射とはほぼ等しい寿命短縮効果を持っていた。線量1.9および5.7Gyの場合のデータは現在のところ若い成体期までに限られるが、その範囲での寿命短縮の大きさと照射時の日齢の関係は3.8Gyの場合と同じである。

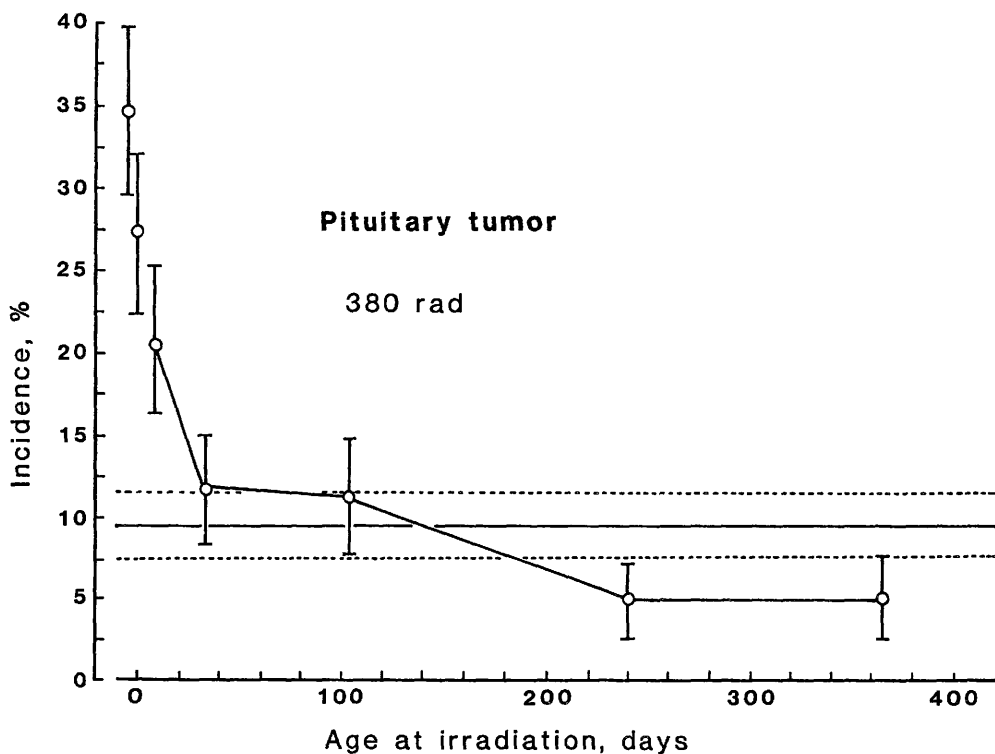


図2. 下垂体腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。条件は図1と同じ。縦軸は発生率。横軸に平行な実線と点線は対照群における発生率と標準誤差の範囲を表す。

次に、各種腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性を順次図により示す。図2は3.8Gy照射後の下垂体腫瘍発生率と照射時の日齢の関係である。この腫瘍は胎生17日、0日および7日齢の照射により発生率が増加した。35日齢以後の照射は有意の増加を起さなかった。胎生後期と新生児期の照射により高い頻度で発生し、この腫瘍による死亡時期は対照群より早かった。胎生後期のマウスが高い感受性を持つことは特に興味深い。胎

生期の何日齢から感受性を持つようになるのかについては現在検討中である。胎児期後期や新生児期の1.9Gyの照射によっても下垂体腫瘍は高い頻度で発生した。線量効果関係についてのデータは割愛する。

図3は骨腫瘍誘発に関する感受性の年齢依存性である。組織学的には骨肉腫が多く、発生部位は全身の骨格に分布し特に好発する部位はない。さほど高い発生率とはならず数%程度ではあるが、

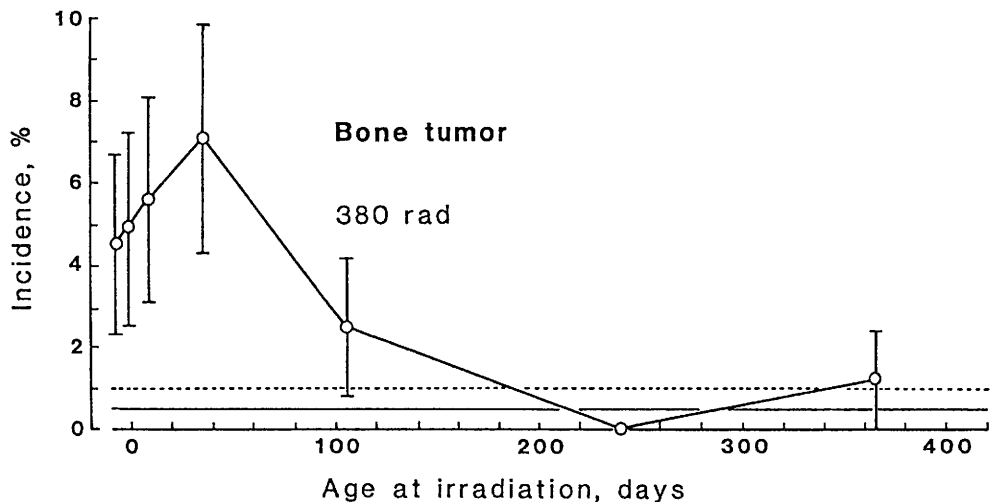


図3. 骨腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。

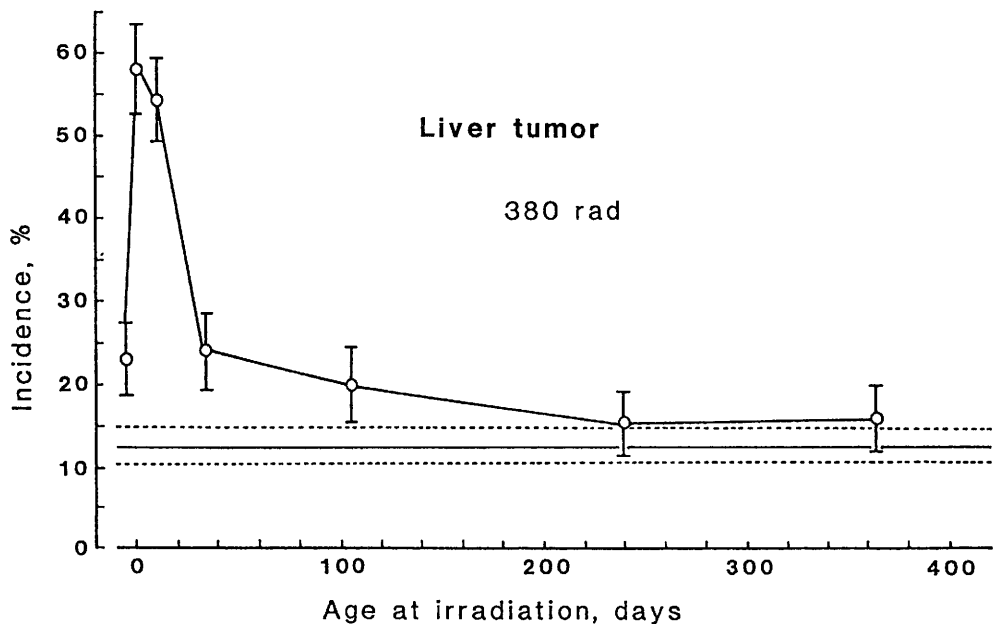


図4. 肝腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。

誘発に関する感受性の年齢依存性は知ることができた。35日齢およびそれよりも若い時期、すなわち胎児期後期と幼若期の照射が誘発効果を持っていた。成体期の照射によっては発生率は増加しなかった。

0日と7日齢は肝腫瘍の誘発に関して著しく高い感受性を持っていることが明らかとなった(図4)。組織学的には肝細胞型が大部分である。新

生児期の照射により発生した肝腫瘍は悪性のものが高頻度に認められた。胎生17日および出生後35日齢の照射によっても肝腫瘍の発生率は増加した。成体期の照射は誘発効果を持たなかった。

図5は肺腫瘍誘発についての感受性の変化である。この図に示したデータは異なる線量レベルの三群を合わせたものである。一群当りの動物数はほぼ等しいので、このやり方に誤りはないと思わ

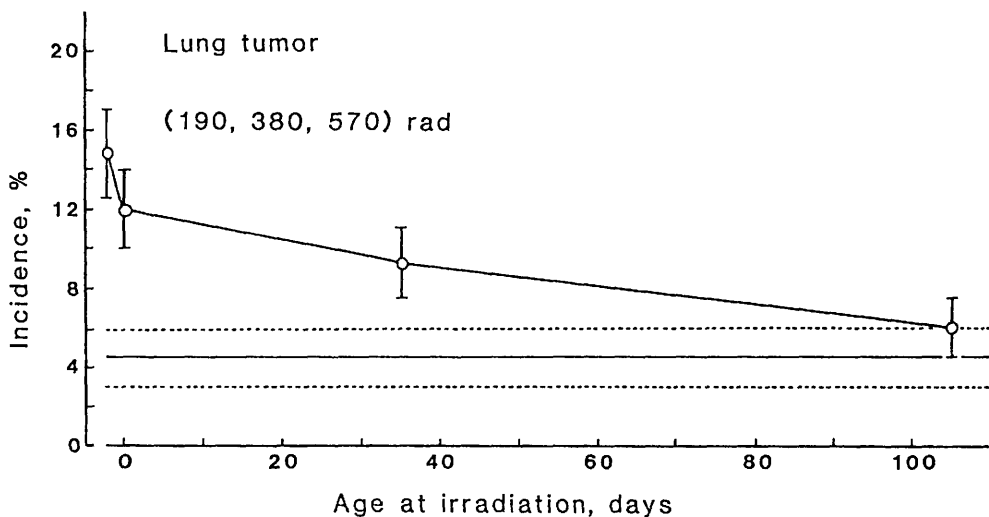


図5. 肺腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。

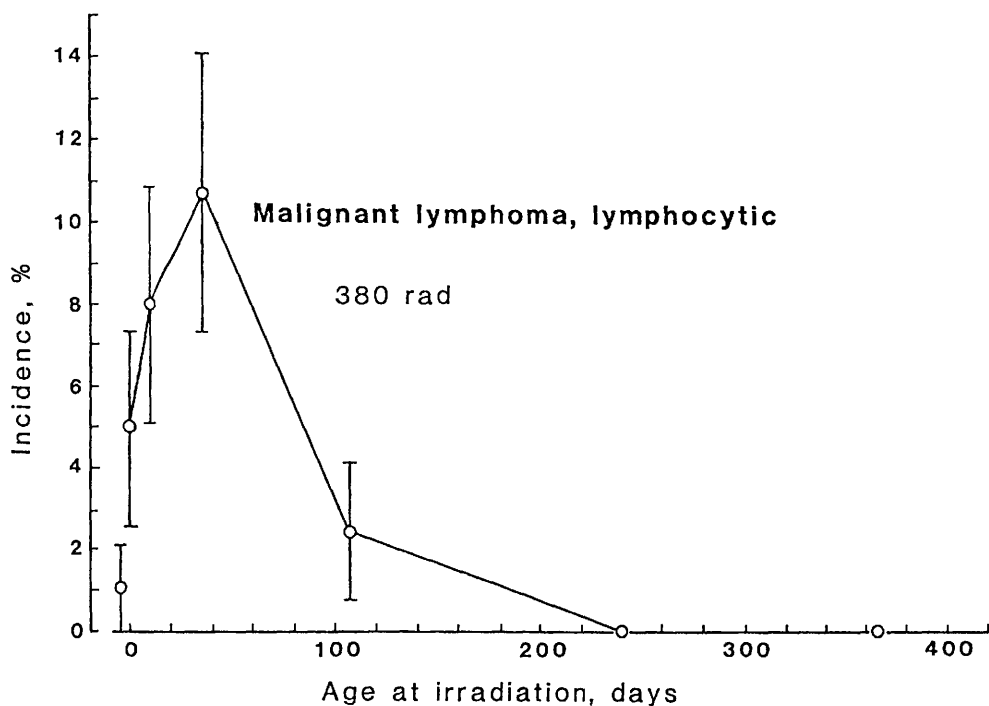


図6. リンパ球型リンパ腫の誘発に関する感受性の年齢依存性。

れる。個々の線量グループの発生率は動物数があまり多くないために対照群と有意の差とならない場合があったので、このようにグループの結合をして感受性の年齢依存性を求めたのである。この図から明かなように、肺腫瘍誘発に関する感受性は年齢が進むにつれてゆっくりと低下して行くといえる。しかしその低下は下垂体腫瘍や肝腫瘍の場合に比べるとはるかにゆるやかである。胎児期後期や新生児期がかなり高い感受性を持つことは注目される点である。

リンパ球型リンパ腫の誘発に関する感受性の年齢依存性を図6に示す。約半数は胸腺型であり、残りの半数は浅部リンパ節等の腫脹を特徴とする非胸腺型である。いずれもリンパ芽球様の細胞より成る。図6から分かるように誘発に関する感受性のピークは新生児期から性成熟期の間である。3.8Gyの場合には最高の発生率は35日齢照射群に見られた。5.7Gyの場合は最高の発生率は0日齢照射群にあった。線量効果関係の形が年齢により違うらしい。成体期は幼若期より感受性が低い。3.8Gyを胎児期後期に照射した場合にはリンパ球型リンパ腫の発生率は対照群と差がなかった。しかし5.7Gyを照射した群では発生率の増加を認めた。すなわち、胎児期後期のマウスはリンパ球型リンパ腫の誘発に感受性を持っていることが分かった。これは新たな知見であったので、確認するための実験をB10系雌マウスを用いて行った。胎生18日、すなわち出生の1日前、に $\gamma$ 線を3.8Gy照射した場合の全死因、脳水腫、リンパ球型リンパ腫およびその他の死因による死亡の頻度分布を図7に示す。それぞれの百分率と平均死亡日齢をも図中に記した。この系統の対照群の平均寿命は810日であったので、著しく短縮したことになる。対照群におけるリンパ球型リンパ腫の発生率は0.0%であった。胎児期末期はこの腫瘍の誘発に関する感受性を持っていることが明瞭に示された。

次は卵巣腫瘍である。図8は3.8Gy照射後の発生率と照射時の日齢の関係である。卵巣腫瘍は全ての照射群において発生率が増加した。新生児期から若い成体期までが感受性が高い。胎児後期の照射によりさほど発生率は高くないが有意差のある増加が認められた。成体期においては年齢が進むにつれて感受性が低下して行く。

マウスのハーダー氏腺は放射線による発がん到高感受性の器官である。図9は3.8Gy照射後の発生率と照射時の日齢の関係である。ハーダー氏

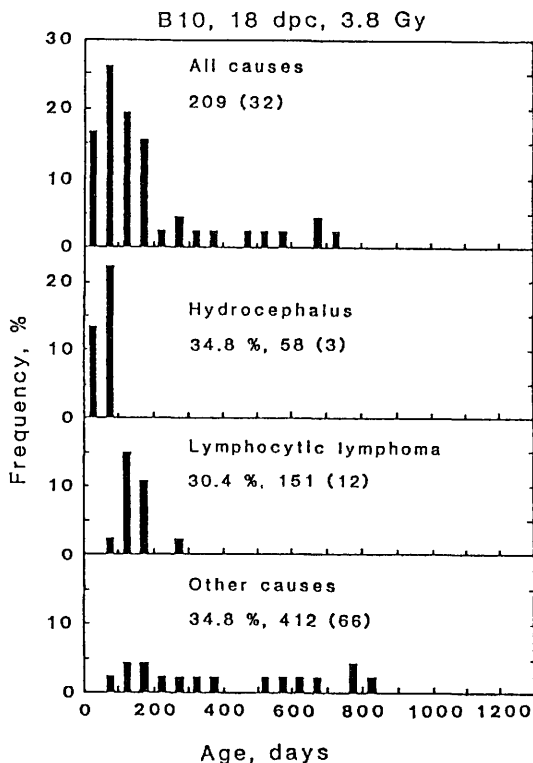


図7. B10系雌マウスの胎生18日齢にガンマ線を3.8Gy照射した後の全死因、脳水腫、リンパ球型リンパ腫およびその他の死因による死亡日齢の頻度分布。

腺腫瘍は胎児期と0日齢の照射によっては発生しなかった。しかし7日齢の照射後には発生率が増加した。最も高い発生率は35日および105日齢の照射群に見られた。ハーダー氏腺腫瘍は240日および365日齢の照射によっても誘発されたが、より若い時期に比べると感受性が低いことは明らかである。

骨髄性白血病は胎児期、0日齢および7日齢の照射によっては発生しなかった。35日齢以後の照射が誘発効果を持ち、最も高い発生率は105日齢照射群に見られた。感受性のピークが最も遅い時期にあるのはこの骨髄性白血病であった。

組織球型リンパ腫はB6C3F<sub>1</sub>マウスに高率に自然発生する腫瘍である。放射線照射により発生率が増加することはなく、逆に発生率は低下した。その低下に関して照射時年齢依存性が見られた(図11)。胎児期および新生児期の照射により著しく発生率が低下した。組織球型リンパ腫は高齢期に発生する腫瘍なので、成体期照射による発生率低下は寿命短縮によるとして説明できると思われるが、胎児期や新生児期の照射後の顕著な低下は

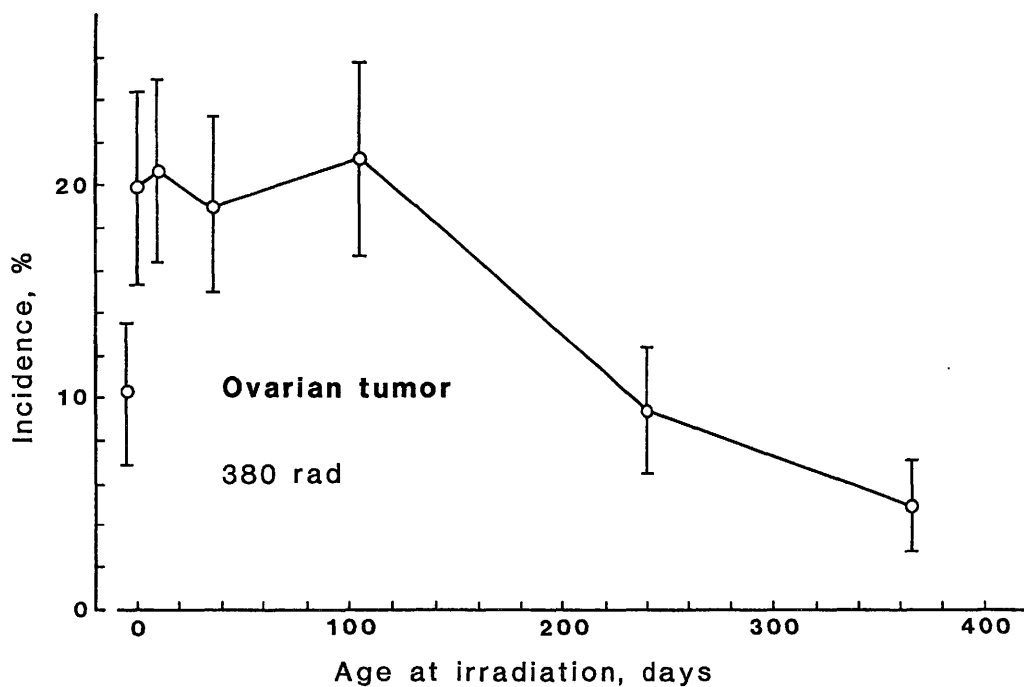


図8. 卵巢腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。

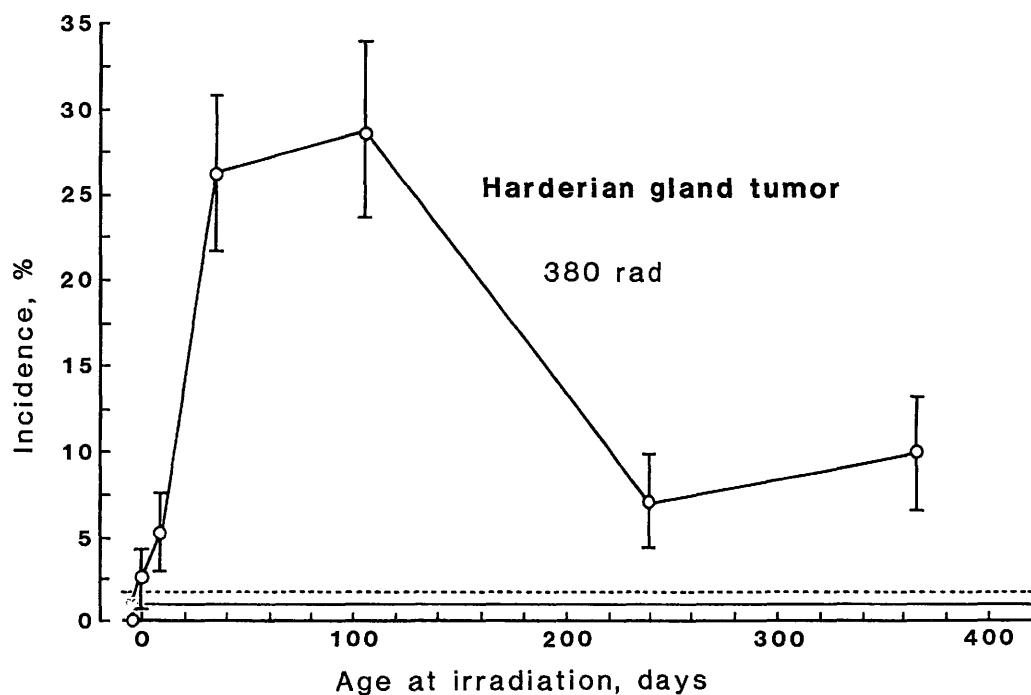


図9. ハーダー氏腺腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。

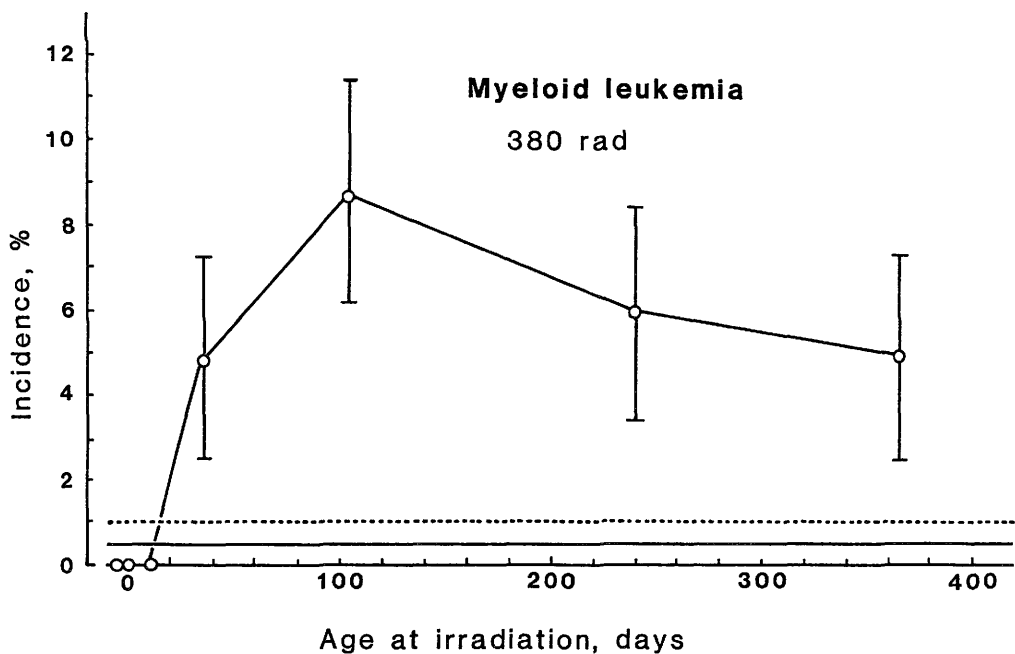


図10. 骨髓性白血病の誘発に関する感受性の年齢依存性。

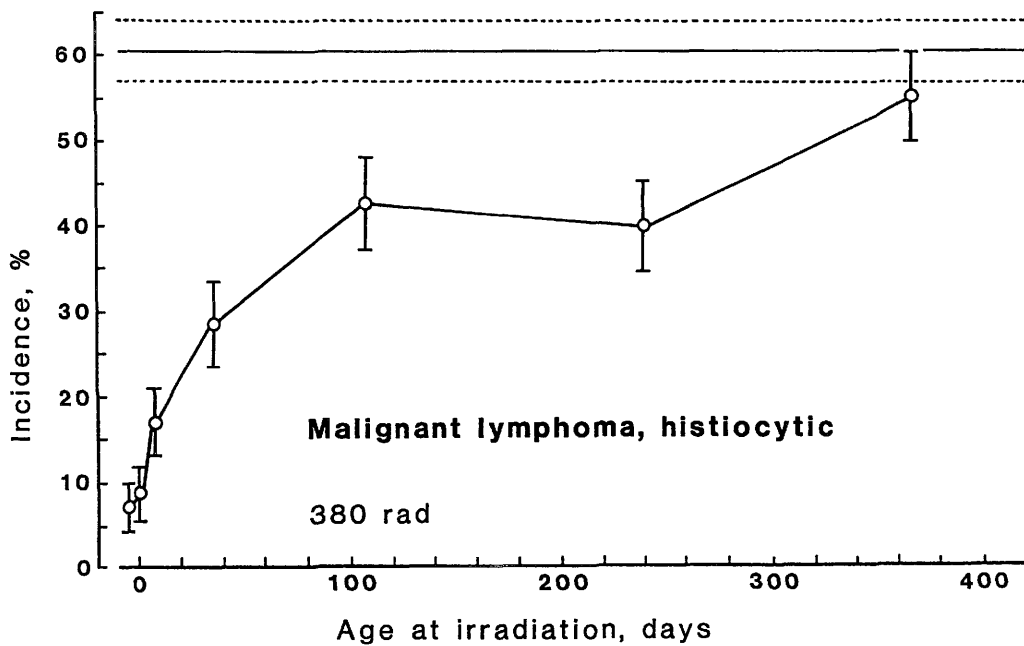


図11. 組織球型リンパ腫の放射線による発生率低下に及ぼす照射時の日齢の影響。

真の抑制を考えないと説明できない。

これまで述べてきた腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性を表1にまとめた。ただし組織球型リンパ腫は放射線により増加しないので除いた。腫瘍の種類により誘発に関する感受性の年齢依存性が異なることが一目瞭然である。新生児期の照射により誘発されやすい腫瘍と成体期の照射により起こりやすい腫瘍は異なることも明らかである。骨髄性白血病とハーダー氏腺腫瘍は新生児期

の照射では誘発されず、下垂体腫瘍、骨髄瘍および肝腫瘍の誘発に関しては新生児期の方がはるかに感受性が高い。リンパ球型リンパ腫、肺腫瘍および卵巣腫瘍の誘発に関する感受性がある年齢の幅はかなり広いが、若い成体期以前に感受性のピークがある。胎児期後期の性質は新生児期のそれに似ている。しかし、リンパ球型リンパ腫、肝腫瘍および卵巣腫瘍の誘発に関する感受性がある年齢の幅はかなり広いが、若い成体期以前に感受性のピークがある。胎児期後期の性質は新生児期のそれに似ている。しかし、リンパ球型リンパ腫、肝腫瘍および卵巣腫瘍の誘発に関しては新生児期の方が感受性が高い。

図12は死亡時に腫瘍の存在を認めた個体の百分率の放射線照射による増加と照射時の日齢との関係である。組織球型リンパ腫はこの場合にも除いている。対照群における腫瘍を持つ個体の百分率は31%であった。図12から明らかなように腫瘍を持つ個体の百分率の増加に関しては新生児期が最も感受性が高く、その後次第に低下して行く。胎児期後期のマウスは新生児期より感受性が低い、この図に示した年齢依存性は図1の寿命短縮に関する感受性のそれとよく似ているといえる。相違点

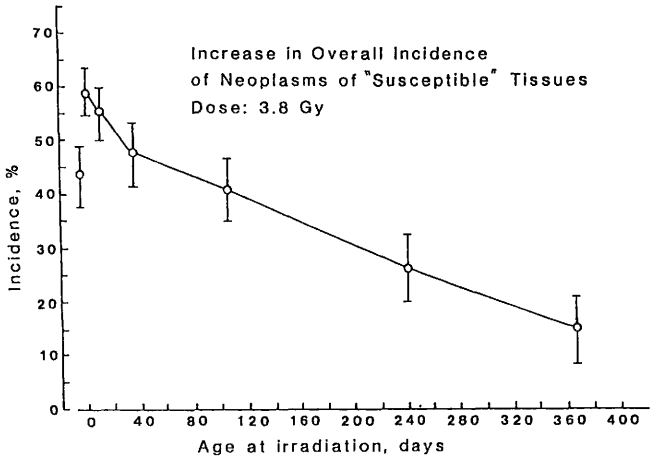


図12. 死亡時に腫瘍の存在を認めた個体の百分率の増加と照射時の日齢の関係。線量は3.8Gy。

表1 8種類の腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。黒丸は顕著な増加、白丸は有意差のある増加、三角は有意差のない増加の傾向を表す。

Neoplasm	Age at irradiation, days						
	-2	0	7	35	105	240	365
Pituitary tumors	●	●	○				
Bone tumors	○	○	○	○			
Liver tumors	○	●	●	○			
Lung tumors	○	○	○	○	△		
Lymphocytic lymphomas	○	●	●	●	○		
Ovarian tumors	○	●	●	●	●	○	○
Harderian gl. tumors			○	●	●	○	○
Myeloid leukemias				△	●	○	△

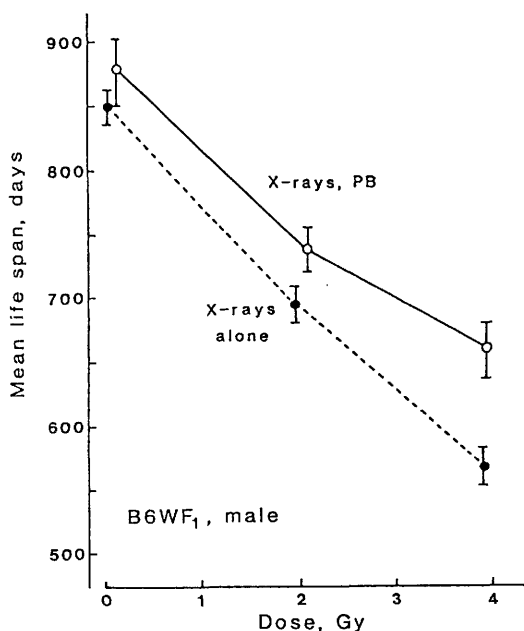


図13. 寿命短縮に関する線量効果関係に及ぼすフェノバルビタール経口投与の影響。5日齢のB6WF<sub>1</sub>雄マウスにX線を照射し、離乳後フェノバルビタールを0.05%に含む飼料を与えた。

表2 新生児期にX線を照射されたB6WF<sub>1</sub>雄マウスにおける年齢別死亡率に及ぼすフェノバルビタールの影響。表中の数値は死亡率、10<sup>-4</sup>/日

実験群	日 齢				
	101-500	501-700	701-900	901-1100	1101-
0 Gy	1.05	9.50	36.81	62.79	179.25
0 Gy + PB	1.90	6.30	22.35	72.41	115.40
3.78 Gy	9.40	47.14	115.04		
3.78 Gy + PB	6.44	17.50	82.39		

は35日齢照射の場合に見られる。35日齢は寿命短縮に関しては0日齢とはほぼ等しい感受性を持つが腫瘍を持つ個体の百分率は0日齢の場合より少ない。これは35日齢の方が骨髄性白血病とリンパ腫の誘発により感受性が高いことによるのであろう。これらは潜伏期の短い腫瘍である。図12の結果は、寿命短縮の主因は腫瘍誘発であることを強く示唆している。

#### b. 放射線照射後の化学物質投与の影響

図13は寿命短縮に関する線量効果関係に及ぼすフェノバルビタール (PB) の影響を示している。放射線照射後の PB 経口投与により放射線による寿命短縮効果が少くなっていることが分かる。放射線を照射せずに PB を与えたグループの平均寿命は無処理群のそれよりもやや長い、

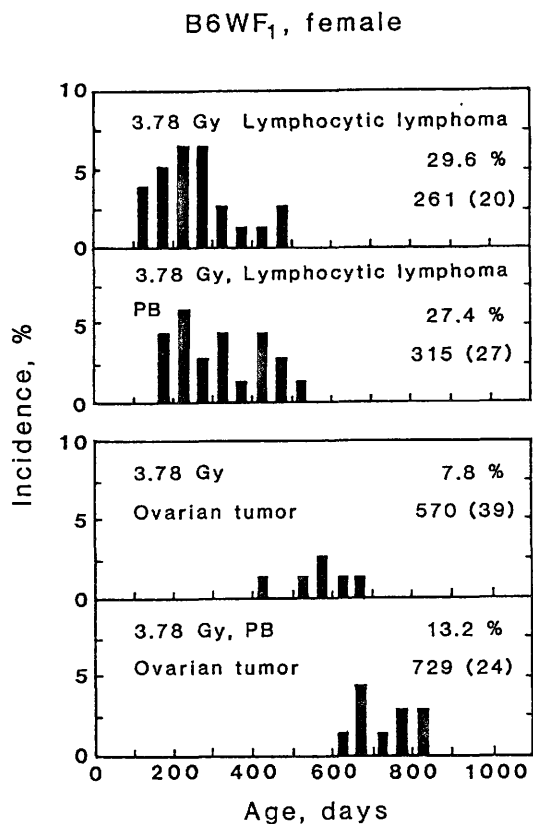


図14. X線照射後のリンパ球型リンパ腫と卵巣腫瘍の年齢別頻度分布に及ぼすフェノバルビタールの影響。B6WF<sub>1</sub>雌マウス。

統計学的な有意差は無い。X線の線量が大いほどPBによる寿命延長効果が大きく、X線単独群との間に有意差が認められる。年齢別死亡率に及ぼすPBの効果をまとめたのが表2である。照射群における死亡率はPBにより全ての年齢幅において低下している。501日から700日齢までの死亡率の低下が最も大きい。ここに示したデータは3.78Gyを照射された雄についてのものであるが、他の照射群においても同様であった。

3.78Gyを照射された雌マウスにおけるリンパ球型リンパ腫と卵巣腫瘍の年齢別頻度分布をまとめたのが図14である。リンパ球型リンパ腫の発生時期はPB投与群の方がやや遅いが、X線単独群との間に有意差はない。一方、卵巣腫瘍の発生時期はPB投与群において明らかに遅い。発生率はPB投与により低下はしなかった。図15は雄の非照射および3.78Gy照射群の肝腫瘍の発生に及ぼすPBの影響についてのデータである。肝腫瘍はPBの投与により発生率が増加した。その組織型は良性の肝細胞型が大部分であった。

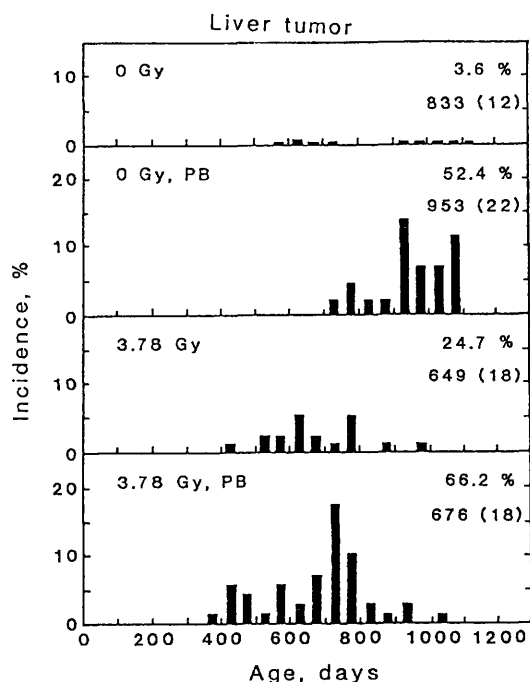


図15. 対照群およびX線照射群における肝腫瘍の年齢別頻度分布に及ぼすフェノバルビタールの影響。B6WF<sub>1</sub> 雄マウス。

表3 肝腫瘍、卵巣腫瘍およびリンパ腫の誘発に関するマウスの系統差。0日齢にガンマ線を3.8Gy照射。

	肝腫瘍, %		卵巣腫瘍, %		リンパ腫, %	
	対照群	照射群	対照群	照射群	対照群	照射群
B6C3F <sub>1</sub>	12.6	56.8	0.0	14.8	0.0	4.9
C57BL/6J	7.2	15.0	0.0	8.3	0.0	10.0
C3H/He	73.3	43.9	5.0	31.6	0.0	3.5
B10/Sn	1.3	8.0	0.0	6.0	0.0	52.0
B10BR/Sn	0.0	3.2	0.0	4.8	1.5	50.0

肝腫瘍はX線のみによっても誘発された。やはり肝細胞型が大部分であったが、悪性のものもかなり含まれていた。X線を照射したマウスにPBを投与すると肝腫瘍の発生率はさらに増加した。その発生時期はX線単独群よりも遅かった。この場合のPBの効果は相加的であると思われる。

#### c. 系統差と種間差

B6C3F<sub>1</sub>, C57BL/6J, C3H/He, B10/Sn および B10BR/Sn マウスの対照群と新生児期にガンマ線を3.8Gy照射した後の肝腫瘍、卵巣腫瘍ならびにリンパ球型リンパ腫の発生率を表3にまと

表4 8日または20日齢にX線を照射された22週齢のラットの肝臓における膜結合性ATPase活性低下細胞集団の数

線量 rad	ATPase(-) 細胞集団の数/cm <sup>2</sup>	
	8日 <sup>1)</sup>	20日 <sup>1)</sup>
0	0.74 ± 0.25 <sup>2)</sup>	0.41 ± 0.17 <sup>2)</sup>
50	4.06 ± 1.04	1.46 ± 0.55
100	5.48 ± 1.56	3.15 ± 1.56
400	28.54 ± 4.73	13.32 ± 3.45

1) 照射時の日齢 2) 平均±SE

めた。肝腫瘍はC3Hを除く4種類のマウスにおいて照射により増加した。自然発生率の高いC3Hと自然発生率の低いC57BL/6との雑種第一代B6C3F<sub>1</sub>は放射線による誘発に関して高感受性であることは興味深い。B6C3F<sub>1</sub>雌マウスの自然発生率は両親の中間であるがC57BL/6により近い。卵巣腫瘍もガンマ線照射により全系統において増加した。C3Hはとび抜けて高感受性であるが、この系統には自然発生が数パーセント起こることが注目される点である。その他の系統の自然発生率は低い。リンパ球型リンパ腫の誘発に関してはB10ならびにB10BRが高感受性が高い。これらの両系の間には差がなかった。自然発生率は全ての系統において低いがB10BRには低率ではあるが自然発生が見られた。

8日または20日齢にX線を照射された22週齢のラットの肝臓における細胞膜結合性ATPase活性低下細胞集団の数についてのデータをまとめたのが表4である。細胞集団の数は線量に依存して増加していた。8日齢照射後の数の方が20日齢の照射の場合よりも数が多かった。この細胞集団は発がん物質による肝腫瘍誘発の場合の腫瘍の前駆細胞集団に似た性質を持っているといえる。しかし、一年半の飼育期間では肝腫瘍の発生は認めなかった。ラットは放射線による肝腫瘍誘発に関して低感受性であることは既に知られていることであるが、この実験は照射後に腫瘍の前駆細胞らしき集団が線量と照射時の日齢に依存して出現することを示した。

## 4. 考 察

### a. 被曝時年齢

今回の実験はマウスの出生から性成熟までの期間が寿命短縮に関して最も感受性が高いことを示した。成体期に比べるとはるかに短縮率が大い

ことは重要である。寿命短縮に関する感受性の年齢依存性は腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性(図12)とよく似ている。幼若期は腫瘍誘発に関して感受性が高いために寿命短縮に関して感受性が高いことをこの結果は示唆しているといえよう。それぞれの腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性は腫瘍の種類によりそれぞれ異なる。「若ければ若いほど感受性が高い」というようなことがあてはまるのはごく少数の腫瘍の場合である。しかし、誘発に関する感受性がピークとなる時期は全ての種類の腫瘍について若い成体期以前であることは注目してよいことである。胎児期後期のマウスは6種類の腫瘍の誘発に感受性を持つことが明らかになった。B6WF<sub>1</sub> マウスを用いた前回の実験では4種類の腫瘍の誘発に関する感受性を持つことを認めたが、さらにリンパ球型リンパ腫と骨腫瘍の誘発に関する感受性を持つことが認められた。マウスの新生児期は多種類の腫瘍の誘発について高い感受性を持っていることが明らかであるが、マウスの出生時の発生段階はヒトの胎児期に対応していることは注意を要する点である。肝造血、腎臓におけるネフロン形成の進行、小脳における神経細胞ネットワーク形成の進行、血中 $\alpha$ -フェトプロテイン濃度の高さなどがその例である。この点を考慮に入れて、ヒトの胎児期は腫瘍誘発にかなり高い感受性を持つと推察される。ただし、器官形成期以前の照射により腫瘍が誘発されたという報告は我々の実験を含めて存在しない。また、胎児期や新生児期の照射により増加した腫瘍は組織学的には成体型であったことも注目されることである。

#### b. 放射線照射後の化学物質投与の影響

フェノバルビタールは発がん物質による肝腫瘍誘発をプロモートすることが知られている。この実験を開始した当初はX線とフェノバルビタールを組み合わせると肝腫瘍誘発に対して相乗的に作用して寿命はX線単独の場合よりも短くなることを予想した。しかるに、X線による寿命短縮効果はフェノバルビタールにより小さくなった。フェノバルビタールは腫瘍の発生時期を遅くするので、これが放射線による寿命短縮効果の低減の原因となっていると考えられる。フェノバルビタールは下垂体からの成長ホルモンの放出パターンを変化させるという報告が最近出されているので、これが寿命短縮効果低減にも関係があるのかもしれない。しかしこれは今後実証しなければならないことである。

フェノバルビタール単独により肝腫瘍の発生率が増加した。自然発生率の低いラットにおいてはこのような効果はないので、マウスにおいて見られた肝腫瘍の発生率の増加は自然に起こるイニシエーションにフェノバルビタールが作用する結果であろうと考えている。

#### c. 系統差と種間差

肝腫瘍の自然発生率の低いC57BL/6と自然発生率の高いC3H/Heの雑種第一代B6C3F<sub>1</sub>は自然発生率がさほど高くなく、放射線による誘発に高感受性であることは興味深い。この現象が一般性があるとすれば重要なので実験を追加すべきであろう。

自然発生率がある程度高い系統や動物種の方が放射線による誘発に関して感受性が高いという相関が見られた。この現象はこれまでに行なわれた多くの実験結果を見渡すとかなり一般性があるように思われる。理論的裏付けを含めて今後さらに研究を進める必要があろう。

#### 〔研究発表〕

- 1) Sasaki, S. and Kasuga, T. : Life-shortening and carcinogenesis in mice irradiated at the perinatal period with gamma rays. *Life-Span Radiation Effects Studies in Animals*, 357-367, USDOE, 1986.
- 2) Sasaki, S. : Quantitative histologic study on confusion of the cerebellar cortex architecture in perinatally irradiate mice. *Radiation Risks to the Developing Nervous System*, 179-189, Gustav Fischer Verlag, 1986.
- 3) Sasaki, S. : Consequences of prenatal irradiation in mice : cancer and CNS damage as a basis for human risks. *Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research*, Vol. 2, 652-657, Taylor & Francis, 1987.
- 4) Kitagawa, T., Nomura, K. and Sasaki, S. : Induction by X-irradiation of adenosine triphosphatase-deficient islands in the rat liver and their characterization. *Cancer Res.*, **45**, 6078-6082, 1985.
- 5) Minamisawa, T. and Sasaki, S. : The electrocorticograms of the aged mouse X-irradiated at juvenile or young adult. *J. Radiat. Res.*, **25**, 314-318, 1984.

### 3. 放射線誘発リンパ性白血病の発生機序に関する研究

武藤正弘, 久保 聡子, 神作 仁子, 佐渡 敏彦

(生理病理研究部)

## Studies on Radiation-Induced Thymic Lymphomagenesis in B10 Strain Mice

Masahiro Muto, Eiko Kubo, Hitoko Kamisaku and Toshihiko Sado

Division of Physiology and Pathology

With the use of B10.Thy 1 congenic strain mice, we reexamined the earlier results by Kaplan and others that lymphomas could develop from lymphocytes present in the nonirradiated parental thymuses grafted into thymectomized, fractionally irradiated H-2 semiincompatible recipient mice. The results indicated that 37 out of 91 thymectomized and irradiated B10.Thy1.2 mice, which were grafted subcutaneously with neonatal thymuses from B10.Thy 1.1 donor mice, developed lymphomas of which 75% (21/28) were shown to have originated from grafted thymuses. These results reemphasized the indirect mechanism for development of radiogenic lymphomas. To attempt to reveal viral involvement in this process, we examined the rearrangement of various endogenous murine leukemia virus (MuLV) genomes and the leukemogenic potentiality of the bone marrow from fractionally irradiated mice by injecting intrathymically into newborn mice. However, we could not get the evidence that supported the involvement of endogenous MuLV or some kind of transmissible

agents during thymic lymphomagenesis.

We found, with the use of intrathymic injection assay, that "preneoplastic" cells that will eventually develop into thymic lymphomas under the influence of thymic microenvironment first appeared in the thymuses about 4-8 days after irradiation. These "thymus-dependent" preneoplastic cells were termed "thymic prelymphoma cells". These thymic prelymphoma cells were detected in 26.1% (6 of 23) of the test donor thymuses when examined at 14 days and in more than 63% (15 of 24 and 14 of 22) when examined at 21 and 31 days after irradiation.

Fractionated doses of X-irradiation induced drastic reduction of the number of pre T cells in the bone marrow and changed the thymus subpopulation pattern. We also examined the generation of functional cytotoxic T lymphocyte precursors and the changes of expressions of IL-2 receptor, various kinds of oncogenes, T cell receptors during lymphomagenesis. The significance of these findings on radiation-induced thymic lymphomagenesis is discussed.

#### 1. 緒言

放射線により誘発される人間の腫瘍として、白血病は頻度の高いものの一つである。この白血病の動物モデルとしてのマウスの放射線誘発白血病

は、古くから良く研究されているが、それがどのようにして発生してくるかについては、まだほとんど解明されていない。すなわち、放射線によってどのような細胞に、どのような変化が起こりそれがどのようにして白血病化して個体を死に至ら

しめるかということである。また放射線によって誘発される白血病の頻度はマウスの系統によってかなり異なるが、そのような系統間差異の原因もよくわかっていない。これらの点が解明されれば、放射線発がんの危険度（リスク）を評価する場合の理論的説明を質的に向上させることが出来るとともに、発癌リスクの低減化の手がかりが得られると期待される。放射線発癌のメカニズムを調べるためには、放射線によって特定の種類の腫瘍が高率に生じる系を使用して、個体レベルから細胞レベルまでがん化の過程が追跡できるような実験が必要である。我々の研究室では、B10.Thy1コンジュニックスマウスを用いて放射線によって高率に胸腺原発のリンパ性白血病（胸腺リンパ腫）が発生する実験系について研究を行って来た。胸腺リンパ腫の研究については、これまでに多くの研究がなされているので、一部それらの結果とも比較検討し、さらに新しい知見を加えることが出来たので報告する。

## 2. 研究方法

(a) マウス：マウスは B10f/Sn (H-2<sup>b</sup>, Thy1.2) (以後 B10.Thy1.2 と略記する)、B10.Thy1.1 (H-2<sup>b</sup>), B10.BRf/SgSn (H-2<sup>k</sup>, Thy1.2) (以後 B10.BR.Thy1.2 と略記する)、B10.BR.Thy1.1, B6C3F<sub>1</sub> (C57BL/6JNrs X C3H/HeMsNrs) F<sub>1</sub> を使用した。B10.Thy1.1 マウスは、佐渡、長沢、神作によって NRH/Nrs マウスからの Thy1.1 マーカーを B10 系マウスに反復戻し交配によって導入して育成されたマウスである。B10.BR.Thy1.1 (H-2<sup>k</sup>) マウスは、B10.BR.Thy1.2 (H-2<sup>k</sup>) ♀ と B10.Thy1.1 (H-2<sup>b</sup>) ♂ を交配して、3 代目の子孫から H-2<sup>k</sup> と Thy1.1 に関してホモ接合体のマウスを選抜して育成したものである。

(b) X線照射：全身照射は、信愛 3 号（島津製作所）を使用して、60R/min, (200KVp, 20mA, 0.5mmCu+0.5mmAl フィルター、半価層 1.24mm, 照射距離 52cm) の条件で行った。マウスは 33±3 日齢から、1.61Gy 8 日ごとに、4 回照射した。

(c) 間接的誘発実験：1 カ月齢の B10.Thy1.2 マウスの胸腺を摘出し、5 日目から、1.61Gy 8 日ごとに、4 回全身照射する。最終照射後 3 時間以内に、非照射の新生児 B10.Thy1.1, 7 日齢の胸腺を、宿主 (B10.Thy1.2) の胸部皮下に移植する。生じてくる胸腺リンパ腫について、donor

由来 (Thy1.1 型) か、recipient 由来 (Thy1.2 型) かを、Thy1 マーカーで調べた。

(d) Thy1 タイピング：細胞浮遊液 (2X10<sup>6</sup>/ml) を、モノクローナル抗体 (T-11-D7) や抗 Thy1.2 抗体 (F7D5) と反応させ、次にウサギの補体と反応させる Shiroishi らによるマイクロサイトキシテイ法によって細胞傷害活性を測定し、Thy1 のタイピングを行った。

(e) 骨髄キメラの作成：10-12 週齢の B10.BR.Thy1.2 マウスを 10.4Gy (<sup>137</sup>Cs  $\gamma$ 線) 照射し、照射後 2-3 時間以内に B10.BR.Thy1.1 マウスの骨髄細胞を、尾静脈より注射して、骨髄キメラを作成した。この場合、骨髄細胞は抗 Thy1.1 抗体と補体処理をした。

(f) T細胞増殖因子 (IL-2) の調整：ConA 1 $\mu$ g/ml, 5X10<sup>-5</sup>M 2ME を含んだ RPMI1640 培養液に、10-16 週齢の B6C3F<sub>1</sub> の脾細胞 (1X10<sup>7</sup>/ml) を浮遊し、24 時間、37℃ で培養する。その後培養上清を遠心により集め、PM-10 アミコンダイアフロームメンブレンフィルターを使用して、10 倍に濃縮する。その後、セファデックス G50 に ConA を吸着させて、RPMI1640 培養液に対して透析を行い、正常胸腺細胞の細胞傷害性 T細胞 (CTL) 活性の誘導能力のテストを行って活性価を測定した。

(g) 胸腺の CTL 活性の誘導：胸腺細胞 (3.4X10<sup>6</sup>) を 14.2 Gy  $\gamma$ 線照射した B10.D2 脾細胞 (1.7X10<sup>6</sup>) とともに Modified Eagle-Hank's medium (5%FCS, 5X10<sup>-5</sup>M 2ME, IL-2; (f) で得られたものを 2ml の培養液あたり 0.1ml 加える) に混合し、リンプロ 24 穴 culture plate で、6 日間培養する。培養後、細胞を遠心して集め、<sup>51</sup>Cr 遊離法により CTL 活性を測定した。

(h) Donor 由来 CTL の活性の測定：培養により細胞傷害性 T細胞を得た後、それらの細胞が donor 由来か、recipient 由来かを決定したい時には、抗 Thy1.1 あるいは抗 Thy1.2 抗体と補体で処理し、<sup>51</sup>Cr 遊離法によりどちらの由来の CTL かを測定した。

(i) <sup>51</sup>Cr 遊離法：標的細胞として L5178Y 細胞 (DBA/2 由来リンフォーマ; H-2<sup>d</sup>) を使用した。1×10<sup>7</sup> 細胞 1ml に 100 $\mu$ Ci の <sup>51</sup>Cr を加えて 37℃ で 1 時間培養し、その後 4 回洗って、<sup>51</sup>Cr ラベルされた標的細胞とした。1 Lytic Unit は、12 時間以内に 4×10<sup>4</sup> 標的細胞を 50% Lysis させるのに必要なリンパ球数として表す。

(j) CFUassay：種々の数の骨髄細胞を、9Gy

照射した同系マウスの尾静脈より注射し、注射後 8 日目の脾臓をブアン固定液で固定して脾臓の表面のコロニーの数を測定した。

(k) 新生児胸腺に骨髓細胞を移植する方法：生後 1 日目の新生児を氷の上に 1～2 分間おき、麻酔する。顕微鏡下で胸骨の上端を 1mm ほど正中線に沿い切開し、ピンセットで広げて、胸腺の左右両葉を見える様にする。先端を細くしたキャピラルで 10 $\mu$ l を両葉に注入する。その後ナイロン縫合糸 (7-0, 協和メデイカル) を使用して縫合する。

(l) マウスの胸腺内への細胞の注射：6-9 週齢のマウスに Nembutal (Abbott Lab, North Chicago, 5mg/ml in saline) を 0.01ml/g 体重で注射して麻酔する。胸骨の上端を 5mm ほど正中線に沿い切開し、ピンセットで広げて、胸腺の左右両葉を見える様にする。32 ゲージの針をつけた 0.2ml 注射器で 50 $\mu$ l 注入した後、クリップで縫合する。

(m) 骨髓中の pre T 細胞の定量：B10.Thy1.1 マウスの骨髓細胞の数をいろいろ変えて、3.79Gy 照射した B10.Thy1.2 マウスの胸腺に移植する。その後 1 ケ月目に、それらの胸腺細胞を蛍光ラベルした抗 Thy1.1 あるいは抗 Thy1.2 抗体を使用して染色し、フローサイトメトリにより分析した。そして宿主の細胞に生じた供与者由来 T 細胞の頻度を調べ、骨髓細胞中にある pre T 細胞の数を限界希釈法を用いて解析した。

(n) 二重蛍光染色：胸腺細胞に、FITC 標識した抗 IL-2 リセプター抗体 (3C7) または抗 L<sub>3</sub>T<sub>4</sub> 抗体 (GK1.5) と、biotin 化した抗 L<sub>3</sub>T<sub>4</sub> 抗体または抗 Lyt-2 抗体を加えて混合し、0℃、30分保温する。その後 3 回 PBS, 5%FCS, 0.02% NaN<sub>3</sub> で洗浄後、phycoerythrin-streptavidin (ペクトンデイキンソン) を加え、0℃、30分保温する。3 回 PBS 5%FCS, 0.02% NaN<sub>3</sub> で洗浄後、Flow Cytometry (FACStar またはオルソサイトフロログラフ IIS) で分析した。

(o) mRNA の発現量の定量：細胞を、4M グアニジンチオシアネート、25mM NaCitrate、0.5%Na-N-lauroylsarcosine でホモジナイズし、CsCl 溶液 (5.7M CsCl, 0.1M EDTA) の上に重層し、35,000rpm, 15℃ で 15 時間遠心を行う。得られたペレットを水に溶かし、フェノールで除蛋白して、RNA を得た。これらの RNA をニトロセルローズメンブレンフィルター上に、15 $\mu$ g 吸着させ、80℃ 2 時間処理する。その後、

これらのフィルター上の RNA を、<sup>32</sup>P ラベルした種々のプローブとハイブリダイズさせ、オートラジオグラフを行うとともに、メンブレンを切出し、液体シンチレーションカウンターで、その放射活性を測定し、mRNA の定量を行った。

(p) 胸腺内移植アッセイ系等による T 細胞分化の研究：他の研究者との協力を得て、B10.Thy1 コンジェニックマウスを使用した胸腺内移植アッセイ系等によって、T 細胞分化の研究を行った。

### 3. 結果

(1) 胸腺リンパ腫発生における放射線の間接効果：1956年に Kaplan らが (C57BL X C3H)F<sub>1</sub> マウスの胸腺を摘出後、1.61Gy, 4 回照射し、それに C57BL 系の新生児マウス胸腺を移植すると、放射線照射されていない移植胸腺由来のリンパ球から、胸腺リンパ腫が発生することを報告して以来、放射線誘発胸腺リンパ腫の発生には放射線によって誘発された感染性の因子 (内因性ウイルス) が関与していると考えられるようになった。しかしながら、これまでの多くの研究者の努力にもかかわらず、そのことを直接的に証明するような結果はまだ得られていない。このことに関連して Kaplan らが用いた実験系は親系の胸腺を F<sub>1</sub> マウスに移植するという系であったので、免疫学的には必ずしも適当な組み合わせではないという弱点があった。しかしながら、この実験結果は、放射線発がんのしくみを理解する上で極めて重要な問題であるので、免疫学的に理想的と考えられる Thy1 congenic 系統のマウスの組み合わせを用いて、この実験を行った。すなわち、1 カ月齢の

表 1 放射線によって胸腺リンパ腫が間接的に誘発されることの実験的証拠

#### A. 発生率

実験群	宿 主	処 置	移植胸腺	マウスの数	白血病の発生数 (%)
1.	B10. Thy1.2	胸腺摘出 1.61Gy×4	B10. Thy1.1	91	37 (40.7)
2.	B10. Thy1.2	1.61Gy×4	な し	27	26 (96.3)
3.	B10. Thy1.2	胸腺摘出 1.61Gy×4	な し	21	1 (4.7)
4.	B10. Thy1.2	胸腺摘出	B10. Thy1.1	23	0 (0.0)

#### B. 実験群 1. の Thy 1 抗原のタイピング

Thy 1 マーカー	発生率 (%)
Thy 1.1 (移植胸腺由来)	21/28 (75.0)
Thy 1.2 (宿主由来)	5/28 (17.9)
Thy 1 陰性	2/28 (7.1)

生後 4 週齢で胸腺を摘出し、分割照射したマウスの胸部皮下に新生児胸腺を移植後発生した胸腺腫のタイプと発生率を調べた。

B10. Thy1.2 マウスから胸腺を摘出し、5日後から、1.61GyのX線を4回、8日ごとに全身照射し、そのあとで非照射の7日齢の B10.Thy1.1 マウスの胸腺を胸部皮下に移植して、生じてくる胸腺リンパ腫について、donor 由来 (Thy1.1 型) か、recipient 由来 (Thy1.2 型) かを Thy1 マーカーで調べた<sup>15)</sup>。その結果は、表1に示すように、実験に用いられた91匹の内で胸腺リンパ腫が37匹に生じ、その中で typing 出来たものの内、75% (21/28) が donor 由来の胸腺リンパ腫であった。また、17.9% (5/28) が recipient 由来、7.1% (2/28) が Thy1 マーカー陰性であった。これらの結果は、Kaplan が示唆したように、やはり照射個体に何らかの感染可能なウイルス様因子が生じて、それが移植胸腺に含まれている未熟な胸腺細胞を癌化させたか、あるいはさらに別の可能性として、例えば照射個体の骨髄由来細胞と移植胸腺に含まれている未熟なリンパ球との間の複雑な細胞間相互作用により、移植胸腺に含まれている未熟な胸腺細胞を癌化させるようなある変化が引き起こされたことを示唆している。

これらの可能性に関連して、最近、Lieberman (J. Exp. Med.166, 1883-1893, 1987) らは、分割照射した B6.Thy1.1 マウスの骨髄細胞をそのまま、あるいはさらにこれらの骨髄細胞を100Gy照射後、5Gy照射した B6.Thy1.2 マウスに静脈注射して、宿主由来の胸腺リンパ腫が生じるかどうかを調べた。その結果分割照射されたマウスの骨髄細胞を移入した場合には約40%、100Gy照射した骨髄細胞を注射した場合には18.2%の個体に宿主由来の胸腺リンパ腫が生じることを見出し、この結果から感染性のリンパ腫誘発因子が骨髄細胞から胸腺細胞に移行すると結論づけている。しかしこの実験では、宿主を5Gy照射しているにもかかわらず、照射のみによるリンパ腫の発生は見られないとしているが、これはこれまでに知られている多くの実験事実と矛盾しているので、我々は、この報告がそのような因子の存在を証明したことになるとは考えていない。

我々は B10.Thy1.2 系の新生児マウスの胸腺に、分割照射した B10.Thy1.1 マウスの骨髄細胞を移植することによってリンパ腫が生じるかどうかを検討した。この場合、宿主は照射していないので、骨髄細胞を移入したグループで、もし宿主由来のリンパ腫が生じれば、感染性のリンパ腫誘発因子が存在していることを証明したことになる。結果は表2に示すように、分割照射したマウ

表2 分割照射したマウスの骨髄細胞を新生児胸腺に移植した後に生じたリンパ腫

実験群	宿主に生じたリンパ腫			
	分割照射 後の日数	頻度	Thy 1陽性	Thy 1陰性
			供与者由来/宿主由来	
1	31日	1/15	0/0	1
2	31日	2/23	0/0	2
3	15日	2/15	0/0	2

分割照射した後、種々の日数後に、B10.Thy 1.1 マウスの大腿骨から骨髄細胞(約  $2 \times 10^7$ )を個体別にとり、細胞浮遊液(20 $\mu$ l/匹)とし、それぞれ10 $\mu$ lずつを2匹のB10.Thy 1.2新生児マウスの胸腺に移植した。実験結果は移植後14カ月までのデータ。

スの骨髄細胞を移入しても、宿主由来のT細胞リンパ腫は1例も生ぜず、Thy1 マーカー陰性のリンパ腫が少数例(9.4%)生じただけであった。以上の様に、骨髄細胞からの感染性のリンパ腫誘発因子が、未熟な胸腺細胞を癌化させて胸腺リンパ腫になるという仮説に関しては、今なお、はっきりとした肯定的なデータは得られていない。

(2) 前リンパ腫細胞の出現時期およびその特性：放射線誘発胸腺リンパ腫の発生過程で、前がん細胞としての前リンパ腫細胞と呼ばれる段階があるかどうか、そしてもしそういう段階の細胞があるとした場合、それと自律性をもった胸腺リンパ腫細胞とはどこがどう違うか、さらに前リンパ腫細胞はいつどこで生じるのかなどを調べるために、B10.Thy1 コンジュニックスマウスを使用して、次のような実験を行った。

分割照射後1カ月目のB10.Thy1.1マウスの胸腺細胞と4カ月目の胸腺リンパ腫細胞との増殖能力の違いを検討するため、それらの細胞数を変えて、(a) 3.79Gy照射したB10.Thy1.2マウスの胸腺に直接移植した場合と、(b) 照射していないB10.Thy1.2マウスの腹腔内に移植した場合について比較を行った。その結果、照射後4カ月目の、すでに胸腺リンパ腫として確認できる状況になった細胞は、胸腺に移植した場合でも、腹腔内に移植した場合でも、それらの移植部位で活発に増殖して、donor 由来のT細胞リンパ腫を生じた。これに対して、照射後1カ月目の胸腺細胞は、胸腺に移植した場合にはdonor 由来のT細胞リンパ腫を生じたが、腹腔内へ移入した場合には1例もT細胞リンパ腫を生じないことがわかった。そこで、このように3.79Gy照射されたマウスの胸腺内では増殖してT細胞リンパ腫を生じるが、腹

腔内ではリンパ腫を生じることが出来ない細胞を「前リンパ腫細胞」と定義し、胸腺内でも腹腔内でも増殖して donor 由来 T 細胞リンパ腫を生じうる細胞を「胸腺リンパ腫細胞」と定義することにした。

そこで次の実験では、前リンパ腫細胞が、分割照射後いつごろから胸腺内に出現するかを検討した。分割照射後、8日目、14日目、21日目、31日目の B10.Thy1.1 マウスの胸腺細胞 ( $4 \times 10^6$ ) を、3.79Gy された B10.Thy1.2 マウスの胸腺に個体別に移植したところ、8日目では 0%、14日目では 26.1%、21日目では 62.5%、31日目では 63.6% の宿主に、donor 由来の T 細胞リンパ腫が生じた (図 1)。この実験では、照射後 8 日目では前リンパ腫細胞は 0% であったが、もっと移植細胞数を増やして、その個体の全胸腺細胞を宿主の胸腺に移入したところ、照射後 4 日目では 4%、8 日目では

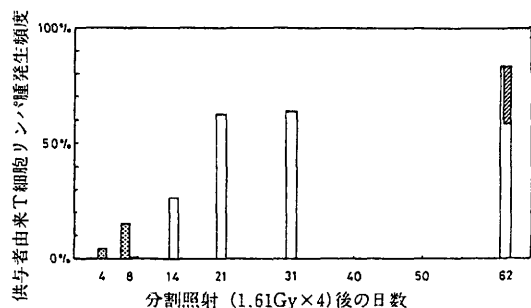


図 1. 分割照射マウスの胸腺中に出現した前リンパ腫細胞の割合

(□)：分割照射した B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞  $5 \times 10^6$  を、3.79Gy 照射した B10.Thy 1.2 マウスの胸腺に移植。(■)：分割照射した B10.Thy 1.1 マウスの全胸腺細胞を、3.79Gy 照射した B10.Thy 1.2 マウスの胸腺に移植。(▨)：分割照射した B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を、B10.Thy 1.2 マウスの腹腔に移植した後の供与者由来 T 細胞リンパ腫の発生頻度。

は 15%、donor 由来 T 細胞リンパ腫が生じることがわかった。この結果は照射後かなり早い時期 (4-8 日目) から胸腺内に前リンパ腫細胞が出現し始め、21-31 日目には少なくとも 63% 以上の個体の胸腺に前リンパ細胞が出現していることを示している。

また前リンパ腫細胞はいつごろから胸腺リンパ腫細胞に変化するかを調べるために、個体別に照射後 2 カ月目の胸腺細胞を二分して、その一部 ( $4 \times 10^6$ ) を 3.79Gy 照射した宿主の胸腺に移植し、残りの胸腺細胞を何も処置しない宿主の腹腔に移

植し、それぞれの宿主について donor 由来 T 細胞リンパ腫が生じるかどうかを調べた。その結果、照射後 2 カ月目の、約 25% の個体の胸腺には、すでに自律性を持った胸腺リンパ腫細胞が存在していることがわかった。

これに対して、分割照射した個体の骨髓細胞を、3.79Gy 照射したマウスの胸腺内に移植した実験では、donor 由来 T 細胞リンパ腫が 1 例も生じなかった (表 3)。これらの結果から B10 系マウスの場合には、胸腺リンパ腫の原因となる前リンパ腫細胞が骨髓中に発生した可能性は少なく、胸腺内で再生して来た細胞から発生すると考えられる。

(3) 骨髓細胞中の T 前駆細胞 (pre T 細胞) の損傷と骨髓移植による胸腺リンパ腫の発生頻度の低下：表 1 の実験グループ 4 からわかる様に、

表 3 分割照射マウスの骨髓細胞中の前リンパ腫細胞の検索

分割照射 後の日数	胸腺リンパ腫を 発生した個体		Thy1 陰性 リンパ腫	腫瘍を発生 しなかった 個体
	供与者由来 (Thy1.1)	宿主由来 (Thy1.2)		
8	0/19	1/19	4/19	14/19
14	0/19	2/19	2/19	15/19
21	0/20	1/20	3/20	16/20
33	0/18	0/18	3/18	15/18

分割照射された B10. Thy 1.1 マウスの骨髓細胞 ( $10^7$ ) を、3.79Gy 照射した B10. Thy 1.2 マウスの胸腺に移入した。

宿主を分割照射せずに胸腺を移植した場合はリンパ腫が生じないことや、X 線照射直後に正常な骨髓細胞を移植した場合胸腺リンパ腫の発生頻度が著しく低下することから、胸腺リンパ腫の発生のメカニズムを考える場合に、骨髓および胸腺において幹細胞から pre T 細胞を経て T 細胞に分化する道筋でどのような変化が起こっているかを調べるのが非常に重要であると思われる。そこで、我々は照射個体の骨髓細胞中の pre T 細胞の変化について、2 つの面から調べた。

その 1 つは pre T 細胞の機能的な面からみたもので、分割照射した B10.BR.Thy1.1 マウスの骨髓細胞を、致死量 (10.63Gy) 照射した B10.BR.Thy1.2 マウスの尾静脈から移入して、胸腺に生じてくる donor 由来の T 細胞の数及びそれらのキラー T 細胞分化能を調べた。その結果、

分割照射後1ヵ月目の骨髄細胞は、致死量照射されたマウスの胸腺を再生する能力が著しく低下していること及び骨髄 (donor) 由来のキラーT細胞の活性も非常に低下していることが明らかになった。

第2に、照射個体の骨髄細胞中の pre T細胞の数を、限界希釈法を用いて解析した。すなわち分割照射した B10.Thy 1.1 マウスの骨髄細胞の数をいろいろと変えて、3.79Gy 照射した B10.Thy 1.2 マウスの胸腺に移入して、donor 由来のT細胞が宿主の胸腺に出現する頻度を調べ、骨髄細胞中にある pre T細胞の数を解析した (図2)。照射個体の骨髄中の pre T細胞の数について、照射後70日まで経時的に調べてみると、正常の骨髄中の pre T細胞の数に比して、0.8-1.9%程度で全く回復していないことが明らかになった。この結果から、分割照射されたマウスで

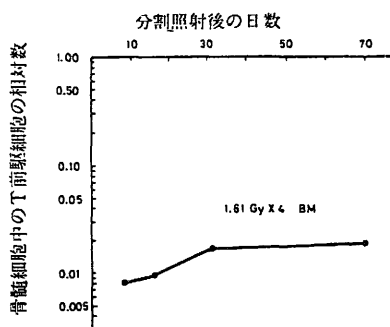


図2. 分割照射マウスの骨髄細胞中のT前駆細胞 (pre T細胞) の相対数。

正常 B10. Thy1.1 マウスの骨髄細胞中の pre T細胞に数に対する分割照射マウスの骨髄細胞中の pre T細胞の数の相対値を示す。

は骨髄中の pre T細胞が著しく枯渇した状態にあることがわかる。さらに最近の実験で、我々は分割照射後正常な骨髄細胞を移植することによる胸腺リンパ腫発生の抑制は、前リンパ腫細胞が出現する8-14日目までに正常な骨髄由来胸腺細胞が再生するような条件で移植が行われた場合には有効であるが、20日目以後に再生するような条件での移植は効果が少ないことを認めた。また別の実験では、致死量の放射線を照射した B10. Thy1.2 マウスに、X線分割照射マウスの骨髄細胞を移植すると宿主由来の胸腺リンパ腫が高頻度に発生することを見ている。これらの結果からX線照射による胸腺の一時的退縮とX線分割照射によってもたらされる骨髄細胞中のT前駆細胞の枯

渇が胸腺リンパ腫発生の重要な要因になっていると考えられる。

(4) 胸腺細胞の分化異常と細胞性癌遺伝子:

前節で述べた様に、分割照射されたマウスの骨髄細胞中の pre T細胞数の極端な減少は、胸腺内でのT細胞の分化を攪乱させる要因となっている可能性が考えられる。実際、分割照射個体の胸腺重量は、分割照射後2ヵ月もすると正常と同じ程度まで回復し、その後も増加し続けるのに、この期間中の照射マウスの胸腺細胞のキラーT細胞活性や混合リンパ球反応活性は非常に低下しており、T細胞の機能分化が正常に進行していないことが示されている。また最近 Defresne<sup>21)</sup> らは、胸腺リンパ腫発生過程で、胸腺細胞の増殖分化に重要な役割を果たすと考えられている Thymic nurse cells の数が著しく減少していることを報告している。

我々は、種々のモノクローナル抗体を使用して胸腺リンパ腫の発生過程での胸腺細胞の表面抗原の変化を検索した。その結果、X線分割照射マウスでは胸腺細胞の細胞構成が大きく変化し、IL-2 リセプターを発現している細胞の割合が増加したり、また本来正常の胸腺細胞では表現していない TL-2 抗原の発現がみられることなどがわかった。

最近種々の細胞性癌遺伝子が分離され、癌の発生とこれらの遺伝子との関係について多くの研究が行われている。丹羽らは、X線で誘発した胸腺リンパ腫について、H-ras, c-myc, pim-1 各遺伝子の転写量を検討して、c-myc については胸腺リンパ腫の約1/3位の例に発現量の増加

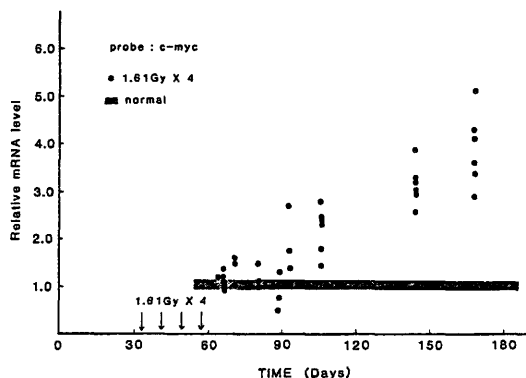


図3. 胸腺リンパ腫誘発過程における胸腺細胞の c-myc mRNA の発現の変化。

正常の胸腺細胞に対するリンパ腫誘発過程の胸腺細胞の c-myc mRNA の発現の相対量を示す。

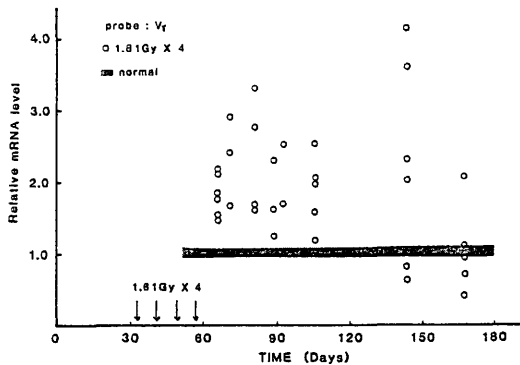


図4. 胸腺リンパ腺誘発過程における胸腺細胞のT細胞抗原レセプター( $\gamma$  chain)の発現の変化。

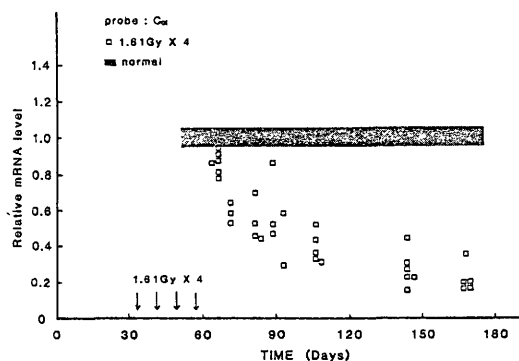


図5. 胸腺リンパ腫誘発過程における胸腺細胞のT細胞抗原レセプター( $\alpha$  chain)の発現の変化。

が認められることを示した。我々は、最近胸腺リンパ腫誘発過程における種々の細胞性癌遺伝子およびT細胞抗原レセプター遺伝子の発現を検討しているが、これまでに得られた知見では、照射後24-31日目にかけて c-myc 遺伝子の発現量の増加が認められ (図3)、それと同時にT細胞レセプターの内では $\beta$ 鎖と $\alpha$ 鎖の発現量が減少し、 $\gamma$ 鎖の発現量が増加することが認められた (図4、図5)。一般に $\gamma$ 鎖は胎児の胸腺細胞や未熟な胸腺細胞に多く発現しており、 $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖は分化した成熟胸腺細胞に発現されている。このことは最近 c-myc 遺伝子産物が、分化に関連する遺伝子を抑制して増殖サイクルに向かわせると言うモデルが提唱されていることと考え合せると興味深い。

最近 Guerrero (Science, 225, 1159-1162, 1984), Diamond (Proc. 8th. ICRP, Vol. 2, 532-537, 1987) らは、RF/J や C57BL/6 マウスの胸腺リンパ腫の約25-30%に、活性化された

k-ras がん遺伝子が含まれていることを報告しており、これらのがん遺伝子が胸腺リンパ腫の発生とどの様に関わっているか大変興味をもたれるところである。

#### 4. 討 論

放射線誘発胸腺リンパ腫は、1.61Gy, 4回照射することにより B10 系のマウスなどに高率に生じさせることが出来、また標的組織における細胞動態、機能分化の解析が比較的容易で、放射線発がんのメカニズムを探るための実験モデルとして好適であると思われる。さらに当研究室で育成された Thy1 congenic 系マウスを用いて、発がんのしくみを探るための移植実験が可能になった。これらの移植実験系を用いて、胸腺リンパ腫は必ずしも放射線に被曝した組織細胞から直接発生するとは限らないことが再確認された。発がんのメカニズムを考える場合、この事実は重要な意味をもつと思われる。最初、この事実から(1) 放射線による内因性の白血病ウイルスが誘発されたためか、(2) 照射個体の骨髄細胞が胸腺に移行して、骨髄細胞からの感染性のリンパ腫誘発因子が、未熟な胸腺細胞をがん化させて胸腺リンパ腫になると考えた。前者の可能性については、これまで多くの研究者の努力にもかかわらず、放射線によって誘発された内因性ウイルスが直接胸腺リンパ腫の発生にかかわっているということを証明するような結果はまだ得られていない。我々も、丹羽らと共同で、X線で誘発された原発胸腺リンパ腫31例について、ecotropic MuLV や xenotropic MuLV に特異的に hybridize する probe を用いて、それらの内在性ウイルスの発現を調べた。その結果 xenotropic MuLV の特異的 probe と hybridize する RNA は、これらの31例の胸腺リンパ腫以外に、正常胸腺細胞においても低いながらも発現がみられ、このウイルスが胸腺リンパ腫の発症に関与しているとは考えにくい結果が得られた。また DNA についても、これらの probe を用いて解析した限りでは、内在性ウイルス遺伝子の新たな組み込みや増幅の証拠を示すことが出来なかった。

次に後者の可能性についてテストするために、生後1日以内の B10.Thy1.2 新生児マウスの胸腺に、分割照射後15日目と31日目の群の骨髄細胞を注射する実験を行った。宿主の新生児は、照射していないので、もし宿主由来リンパ腫が生じた場合、(2)で述べた可能性を考えなければならない。

結果は、宿主由来あるいは供与者由来T細胞リンパ腫のいずれも、生じなかった。このように(2)の仮説に関しては、はっきりとした肯定的なデータは得られていない。

そこで発がん機構の他の可能性を探るため、まず胸腺リンパ腫の前がん細胞である前リンパ腫細胞が、発生する部位と発生時期を検討した。胸腺依存性の増殖を示す前リンパ腫細胞は、照射後かなり早い時期(4-8日目)から胸腺内に出現し始め、21-31日目には少なくとも63%以上の個体の胸腺に前リンパ腫細胞が出現していることが示された。

また表1の実験グループ4からもわかる様に、宿主を分割照射せずに胸腺を移植した場合はリンパ腫が生じないことや、X線照射直後に正常な骨髄細胞を移植した場合、胸腺リンパ腫の発生頻度が著しく低下することから、骨髄および胸腺細胞の細胞動態や機能分化の解析を行うことが、非常に重要であると考えた。骨髄カメラの実験から、分割照射後1カ月目の骨髄細胞は、致死量照射されたマウスの胸腺を再生する能力が著しく低下していること及び骨髄(donor)由来のキラーT細胞の活性も非常に低下していることが明らかになった。また照射個体の骨髄細胞中のpre T細胞の数を、限界希釈法を用いて解析したところ、照射後70日までは、正常の骨髄中のpre T細胞の数に比して、0.8-1.9%程度で全く回復していないことが明らかになった。さらに、分割照射後正常な骨髄細胞を移植することによる胸腺リンパ腫発生の抑制は、前リンパ腫細胞が出現する8-14日目までに正常な骨髄由来胸腺細胞が再生するような条件で移植が行われた場合には有効であるが、20日目以後に再生するような条件での移植は効果が少ないことが示された。これらの結果からX線照射による胸腺の一時的退縮とX線分割照射によってもたらされる骨髄細胞中のT前駆細胞の枯渇が胸腺リンパ腫発生の重要な要因になっていると考えられる。そしてこの様に、分割照射されたマウスの骨髄細胞中のpre T細胞数の極端な減少は、胸腺内でのT細胞の分化を攪乱させる要因となっている可能性が考えられる。実際、分割照射個体の胸腺重量は、分割照射後2カ月もすると正常と同じ程度にまで回復し、その後も増加し続けるのに、この期間中の照射マウスの胸腺細胞のキラーT細胞活性や混合リンパ球反応活性は非常に低下しており、T細胞の機能分化が正常に進行していないことが示された。

## 5. 結 論

これまでに述べた結果から、放射線誘発胸腺リンパ腫の発生機序に関して考察してみると、放射線の反復照射によって骨髄細胞中のpre T細胞が枯渇し、骨髄由来T前駆細胞の胸腺内への移行が減少すること、及び胸腺内でのthymic nurse cellsの数が減少することなどによって、再生してくる胸腺細胞に分化異常が起こり、c-myc等のがん遺伝子あるいはIL-2リセプター等のT細胞の増殖分化に関係する遺伝子の異常発現が起こり、その結果としてがん細胞の出現を見るに至るのではないかと考えている。この仮説を、細胞・分子生物学的に検証することが、我々の当面の研究課題であると考えている。

## 〔謝 辞〕

胸腺リンパ腫に関する我々の研究は、動植物管理課の協力のもとに、放医研で育成、生産されたオリジナルなB10.Thy1コンジュニクマウスを使用してはじめて可能になったものである。関係者の方々に心からの謝意を表したい。

## 〔研究発表〕

- 1) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H. and Kubo, E. : Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy 1 congenic donors. *Cancer Res.*, **43**, 3822-3827, 1983.
- 2) Muto, M., Kubo, E., and Sado, T. : Cellular events during radiation-induced thymic leukemogenesis in mice ; Abnormal T cell differentiation in the thymus and defect of thymocyte precursors in the bone marrow after split-dose irradiation. *J. Immunol.*, **134**, 2026-2031, 1985.
- 3) 武藤正弘、佐渡敏彦：放射線誘発胸腺腫発生機序研究へのB10.Thy 1 congenicマウスの利用。  
実験医学、Vol 4, NO.1, 80-86, 1986.
- 4) 武藤正弘、佐渡敏彦、久保あ子、神作仁子、丹羽太貫：放射線誘発胸腺腫の発生機序。  
放医研シンポジウムシリーズ、NO.17, 177-189, 1986.
- 5) 武藤正弘：癌特ミニシンポジウム、広島、

- 1986, 12.
- 6) Muto, M., Kubo, E., and Sato, T. : Development of prelymphoma cells committed to thymic lymphomas during radiation-induced thymic lymphomagenesis in B10 mice. *Cancer Res.*, **47**, 3469-3472, 1987.
  - 7) Sado, T., Kamisaku, H., Kubo, E. and Muto, M. : 8th ICRR, Edinburgh, 1987, July.
  - 8) Muto, M., Kubo, E. and Sado, T. : 8th ICRR, Edinburgh, 1987.
  - 9) 武藤正弘、久保あい子、佐渡敏彦、：放射線誘発胸腺リンパ腫の研究。放射線科学、Vol **31**, No.6, 179-186, 1988.
  - 10) Sado, T., Kamisaku, H., Ikarashi, Y. and Kubo, E. : Immediate and long-term effects of radiation on the immune system of specific-pathogen-free mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**, 177-187, 1988.
  - 11) Hirokawa, K., Sado, T., Kubo, S., Hitomi, K. and Utsuyama, M. : Intrathymic T cell differentiation in radiation bone marrow chimeras and its role in T cell emigration to the spleen. An immunohistochemical study. *J. Immunol.*, **134**, 3615-3624, 1985.
  - 12) Hirokawa, K., Sado, T., Kubo, S., Kamisaku, H. and Utsuyama, M. : Contrasting feature in the repopulation of host-type T cells in the spleens of  $F_1 \rightarrow P$  and  $P \rightarrow F_1$  radiation bone marrow chimeras. *Cellular Immunol.*, **103**, 174-182, 1986.
  - 13) Hirokawa, K., Utsuyama, M., Katsura, Y. and Sado, T. : Influence of age on the proliferation and peripheralization of thymic T cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **112**, 13-21, 1988.
  - 14) Katsura, Y., Amagai, T., Kina, T., Sado, T. and Nishikawa, S. : Two subpopulations of stem cells for T cell lineage. *J. Immunol.*, **135**, 3021-3027, 1985.
  - 15) Katsura, Y., Kina, T., Amagai, T., Tsubata, T., Hirayoshi, K., Takaoki, Y., Sado, T. and Nishikawa, S. : Limiting dilution analysis of the stem cells for T cell lineage. *J. Immunol.*, **137**, 2434-2339, 1986.

## 4. 放射線誘発骨髄性白血病の病理学的研究

吉田 和子, 西村 まゆみ, 根本 久美恵, 関 正 利  
(生理病理研究部)

### Modifying Factors of Radiation Induced Myeloid Leukemia of C3H/He Mouse

Kazuko Yoshida, Mayumi Nishimura, Kumie Nemoto and Masatoshi Seki  
Division of Physiology and Pathology

It is well known that radiation induces leukemia both in man and experimental animals. However, most of radiation-induced leukemia of mice are thymic lymphoma, different from predominant develop of myeloid leukemia in human cases. We found that C3H/He mouse developed myeloid leukemia at high incidence by irradiation. Then, we examined the modifying factors of radiation induced myeloid leukemia of C3H/He mouse.

The incidence of myeloid leukemia did not affect when 1mg of predonisolone acetate (predonine, synthesized glucocorticoid) was injected subcutaneously into C3H/He mice. However, the incidence of radiation induced myeloid leukemia increased significantly by predonine administered after whole body irradiation. The augmentative effects of predonine founded in 0.47GY (3–8%), 1.42GY (20.0–27.8%) and 2.84GY (23.9–38.5%) irradiated groups, however, it was not found in 4.73GY (13.6–11.4%) irradiated group. These results suggested that predonine itself had not the effect of "Initiation" for leukemogenesis, but it pro-

moted the incidence of radiation-induced myeloid leukemia.

Next, we examined whether the incidence of myeloid leukemia was increased with the stimulation of hematopoietic tissues. To this purpose, mice were inserted a piece of cellulose acetate membrane (CAM) into the peritoneal cavity. CAM insertion into unirradiated mice did not affect the incidence of myeloid leukemia at all. On the other hand, the incidence of leukemia increased significantly (37.3%) when CAM were inserted into 2.84GY irradiated mice. But the incidence of leukemia did not increase when CAM were inserted 1 week before irradiated mice (22.4%). From these results, CAM inserted mice after irradiation were proven to increase the incidence of leukemia as same as predonine injected mice. Mice were suffered surgical stress plus inflammatory reaction after CAM insertion, therefore, the surgical stress considered to participate the development of radiation induced leukemia. To resolve this point, several experiments are now in progress.

#### 1. 緒 言

放射線による晩発障害で、白血病はもっとも重要な疾患であるが、これまでマウスの放射線誘発白血病の大部分は胸腺リンパ腫について多くの研

究がなされてきている。しかしながら、ヒトの放射線誘発白血病の大部分は骨髄性であり、この差異が動物実験からヒトへの外挿の際の問題点でもあった。我々は前回の特別研究により、C<sub>3</sub>H/He マウスという極めて手に入れやすい系統のマウス

で照射により高率に骨髄性白血病が発症する事を見出した。そこで大規模な実験が可能となったので、放射線誘発骨髄性白血病の発症機序について解明する事を最終目的として以下の実験を行った。

白血病は造血幹細胞が何らかの原因で腫瘍化したものであるが、白血病が発症するまでには生体内の各種統御機構が関与している。第1の実験は、放射線によって損傷を受けた造血幹細胞が白血病へと進展していく過程で、この様な統御機構を人為的に変化させて白血病発症の機構を解明する事である。この目的の為、副腎皮質ホルモン投与、炎症反応、外科的ストレス等について検索した。第2の実験は、発症した各種白血病について病理学的、血液学的検索を行い白血病細胞の本質を研究した。

## 実験1. 放射線誘発骨髄性白血病の変更に要因について

### 2. 研究方法

#### a. 副腎皮質ホルモンの影響について

放医研で繁殖した C<sub>3</sub>H/He, CV 雄マウス (8-10週齢) を、0.47GY から 4.73GY X線 (20 mA, 200kv, 0.5mmAl+0.5mmCu フィルター、FSD56cm) で全身1回照射した。照射1時間前、直後、24時間後にプレドニソロン、アセテート 1mg、照射直後コルチコステロン 1mg 皮下注射した。マウスは終生飼育し、貧血、脾腫等により白血病と診断されたものは、死亡直前に屠殺し血液学的、病理学的検索を行い確定診断を行った。又、これらの脾細胞は同系雌マウスへ移植し、腫瘍性を検討した。死亡マウスはすべて剖検し病理学的に検索した。造血系腫瘍は、1) 骨髄性白血病 (赤白血病、巨核芽球性白血病を含む)、2) 胸腺リンパ腫、3) 非胸腺型リンパ腫、4) 細網肉腫 A型に分類した。

#### b. 腸の血管透過性の検索

2.84Gy あるいは 2.84Gy 照射直後プレドニンを投与した C<sub>3</sub>H/He 雄マウスを経時的に屠殺し腸の血管透過性を検索した。Pontamine Sky Blue を 50mg/kg の割合で静注し、30分後に屠殺し、生理食塩水で還流後腸をとり出した。取り出した腸は Pyridine で血管を透過した色素を抽出し、620m $\mu$  の波長で分光光度計で比色測定した。

#### c. 造血幹細胞の検索

C<sub>3</sub>H/He 雄マウス (8-10週齢) を 2.84Gy

照射あるいは、照射直後プレドニンを投与し、経時的に屠殺し、脾および大腿骨中の幹細胞数の変化を検索した。顆粒球-単球系に commit した幹細胞 (GM-CFU) は、造血因子として Pokeweed Mitogen で刺激した脾細胞の培養上清を用い、メチルセルロース法で7日間培養した。50個以上の集団をコロニーとしてカウントし GM-CFU とした。多能性幹細胞は Till & McCulloch の方法で検索した。すなわち、致死線量照射した同系マウスへ尾静脈より脾および骨髓細胞を注射し、7日目 (CFUs-7days) あるいは10日目 (CFUs-10days) に屠殺し脾臓をブアン固定後、白色結節の数をかぞえ CFU-S の数とした。CFUs-10days はもっとも未分化な多能性幹細胞であるが CFUs-7days は、ある程度 Commit した幹細胞も含むと現在考えられている。すなわち、分化段階の未熟な順から CFUs-10days, CFUs-7days, GM-CFU となる。

#### d. 炎症反応と外科的ストレスの影響について

マウスに炎症反応をおこさせ造血系に増殖刺激を与える目的でマウスの腹腔内にネプhtール麻酔下で 2.5cm $\times$ 2.0cm のセルロース・アセテート膜 (CA 膜) の小片を外科的に挿入した。CA 膜の挿入は、2.84Gy 照射、1週間前と直後行った。又、外科的ストレスのみの影響を観察する為、ネプhtール麻酔下でマウス腹壁を約 2cm 切開し、直ちに縫合した。マウスは、いずれも C<sup>3</sup>/He 雄又は雌 8-10週齢を使用した。診断等は前実験と同様に行なった。

### 3. 結果

#### 副腎皮質ホルモンの影響について

実験群の構成および結果は表1に示す。

C<sub>3</sub>H/He 雄マウスの骨髄性白血病の自然発症率は1%以下であるが、照射により発症率は有意に増加し、2.84Gy をピークとした線量効果関係を示す。照射直後プレドニンを投与する事により、0.47Gy, 1.42Gy, 2.84Gy では有意に白血病発症率は増加した (表1、図1)。しかしながら、4.78Gy ではプレドニンによる発症率の増加は認められなかった。又、プレドニン投与のみでは、白血病を発症させる事は出来なかった。プレドニンの効果が、どの時期に関与しているのか、照射1時間前、24時間後に投与したが、どちらも照射直後プレドニン投与した群とでは統計学的に有意差は認められなかった。

生理的なホルモンであるコルチコステロンもプ

表1 放射線誘発骨髄性白血病の発症率と副腎皮質ホルモンの効果

	NO. of Mice	NO. of Leukemic Mice				Incidence of Leukemia (%)			
		N. T.	T. L.	Myeloid.	R. S.	N. T.	T. L.	Myeloid.	R. S.
CV (X-Ray)									
Control	110	0	0	1	9			0.9	8.2
Pr. Adm.	100	0	0	1	6			1.0	6.0
0.47 Gy	133	2	0	4	7	1.5		3.0	5.3
0.47 Gy + Pr. Adm.	100	2	0	8	4	2.0		8.0	4.0
1.42 Gy	110	0	1	22	6		0.9	20.0	5.5
1.42 Gy + Pr. Adm.	108	2	0	30	11	1.9		27.8	10.8
2.84 Gy	109	1	0	26	6	0.9		23.9	5.5
2.84 Gy + Pr. Adm.	109	0	0	42	5			38.5	4.6
4.73 Gy	110	3	0	15	5	2.7		13.6	4.5
4.73 Gy + Pr. Adm.	105	0	0	12	6			11.4	5.7
2.84 Gy + Pr. Adm. *									
*1 H. before Irrad.	114	1	1	42	7	0.9	0.9	36.8	6.1
*24 H. after Irrad.	111	1	0	35	4	0.9	0	31.5	3.6
Cortic. Adm.	110	0	0	1	3	0	0	0.9	2.7
2.84 Gy + Cortic. Adm.	108	0	0	26	11	0	0	24.1	10.2

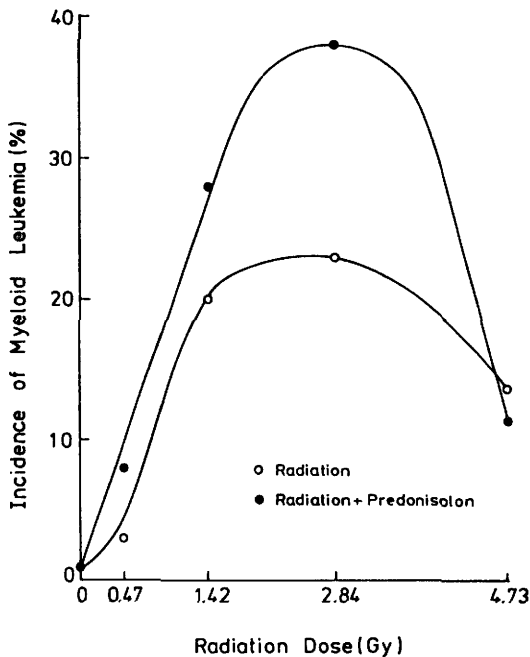


図1. 放射線誘発骨髄性白血病の発症率と照射線量との関係

レドニンと同様な効果があるか否か検討を行った。2.84Gy 照射直後コルチコステロンを投与しても発症率は24.1%と2.84Gy 照射のみと差は全く認められなかった。

リンパ系白血病はC<sub>3</sub>H/He マウスでは、全身1回照射ではほとんど発症しなかった。細網肉腫A型は、自然発症率は8.2%で、照射およびプレドニン等投与により発症率の変化は認められなかった。

白血病の発症時期と頻度との関係を図2に示す。骨髄性白血病のもっと早く発症したものは照

射後125日に出現した。その後、除々に発症し大部分は270日から690日の間に発症し、700日をすぎるとほとんど発症しなかった。これに対し胸腺リンパ腫は比較的若年期に、細胞肉腫A型は老成期に発症した。

照射あるいはプレドニン投与により寿命短縮が生じるか否か検討した(図3)。全実験群は図に示していないが、1.42Gy以上の照射では非照射と比べて有意な寿命短縮が認められた。又、プレドニン投与では2.84Gy照射後プレドニン投与した群のみ照射群との間で有意の寿命短縮が認められたが、0.47Gy、1.42Gy、4.73Gyとプレドニン投与との間では有意な寿命短縮は認められなかった。

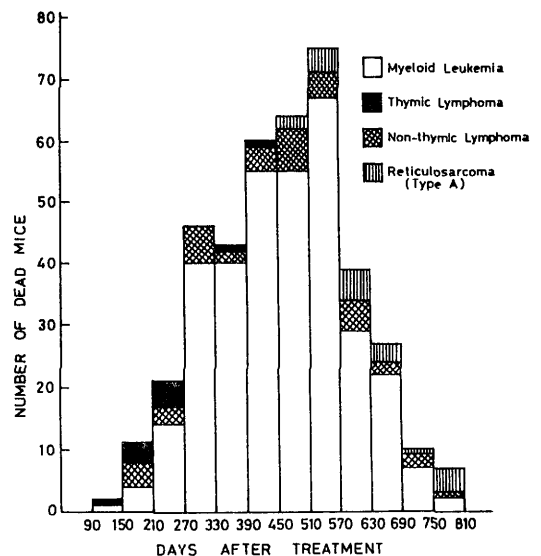


図2. 造血系新生物発生の時間的経過

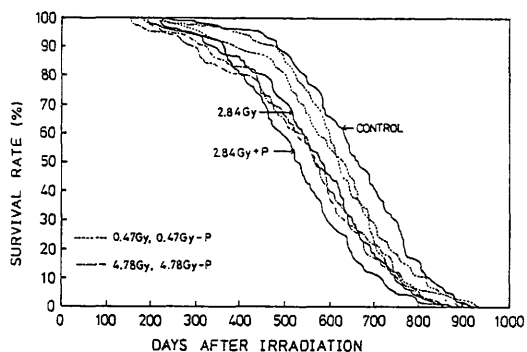


図3. 照射および照射+プレドニン投与後の生存曲線

図4は2.84Gy照射とそれに更にプレドニンを投与した場合の、脾及び胸腺重量の回復の比較である。照射のみに比し、プレドニン投与動物では、両者とも明らかに回復が遅延している。

腸間壁の血管透過性の変化を調べた結果を図5に示す。小腸の血管透過性は、照射後2～4日間にわたり、プレドニン投与群は照射のみの動物より嵩進していた。

図6は、2.84Gy照射とそれに更にプレドニンを投与した場合の脾および大腿骨中のGM-CFUの回復動態を示す。GM-CFUは照射およびプレドニン投与ともほぼ同一の回復パターンを示

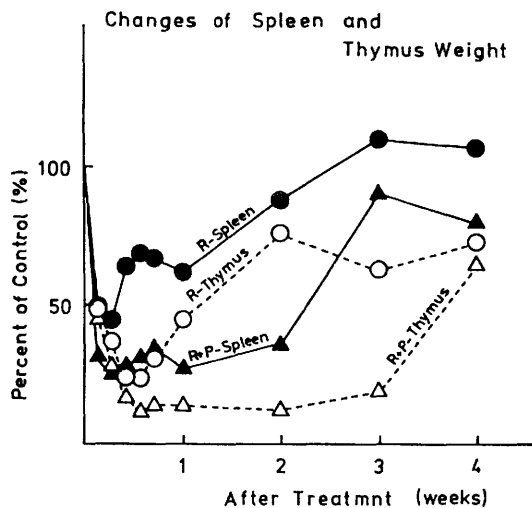


図4. 照射後の脾臓、胸腺重量の変化

R: 2.84Gy 照射  
R+P: 2.84Gy  
照射後プレドニン投与

#### Kinetics of Capillary Permeability

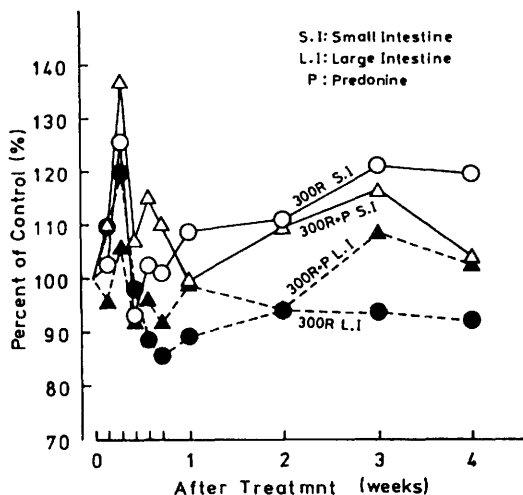


図5. 照射及び照射直後プレドニン投与後の血管透過性の変化

し、骨髄で比較的早く回復しはじめやや遅れて脾臓中のGM-CFUが回復しはじめた。図7に7d-CFUの回復動態を示す。照射とプレドニン投与のどちらの場合もほぼ同様の回復パターンを示すが、プレドニン投与の脾での7d-CFUの回復がやや遅れる傾向が認められた。10d-CFUの回復動態は図8に示す様に照射とプレドニン投与群とは異なったパターンを示した。すなわち、2.84Gy投与群では大腿骨および脾臓中の10d-CFUは照射後7日目より回復しはじめたが、照射後プレドニンを投与した群では19日目より回復はかなり遅れて観察された。

炎症反応と外科的ストレスの影響について

マウスの腹腔内へCA膜を挿入すると、膜の表面はマクロファージとファイブロblastからなる細胞層でおおわれる。この様な炎症反応によって造血系に刺激を与え、白血病の発生頻度を変化させるか否か検討した。実験群の構成および結果は表2に示す。CA膜を挿入する事によって骨髄性白血病は発症しなかった。照射1週間前にCA膜を挿入した群は、2.84Gy照射のみと比較して骨髄性白血病の発症率の差は認められなかったが、2.84Gy照射直後CA膜を挿入した群の発症率は37.3%と照射のみの群と比較して統計学的に有意に高かった。雌マウスの骨髄性白血病の自然発症率は4～6%で雄マウスより、やや高頻度で発症する傾向が認められたが、両者の間に統計学的有意差は認められなかった。雌マウスも雄

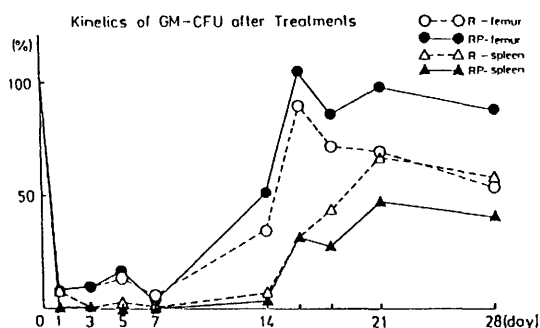


図 6. 照射および照射+プレドニン投与後の GM-CFU の回復動態

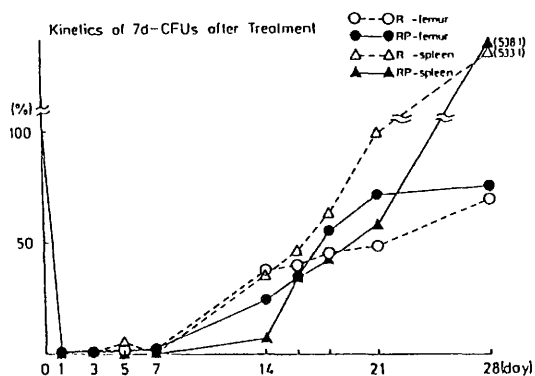


図 7. 照射および照射+プレドニン投与後の 7 d-CFUs の回復動態

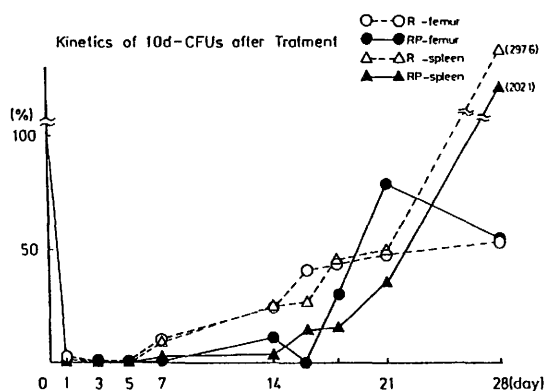


図 8. 照射および照射+プレドニン投与後の 10 d-CFUs の回復動態

マウスと同様、照射により骨髄性白血病は有意に高頻度で発症したが、発症率は雄と比べて低かった。又、CA 膜挿入も雄マウスと同様の結果が得られたが、雌マウスは全体に雄マウスより骨髄

表 2 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼす炎症反応の効果

EXP. CONDITION	NO. OF CASES	INCIDENCE(%)
MALE		
CONTROL	1/110	0.9
CA	0/50	0
2.84 GY	26/109	23.9
CA+2.84 GY	11/49	22.4
2.84 GY+CA	19/51	37.3
FEMALE		
CONTROL	2/49	4.1
CA	2/52	3.8
2.84 GY	6/50	12.0
CA+2.84 GY	8/50	16.0
2.84 GY+CA	13/50	26.0

表 3 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼす開腹手術の効果

EXP. CONDITION	NO. OF CASES	INCIDENCE(%)
MALE		
CONTROL	1/110	0.9
SO	0/53	0
2.84 Gy	26/109	23.9
SO+2.84 Gy	15/49	30.6
2.84 Gy+SO	16/51	31.3
FEMALE		
CONTROL	2/49	4.1
2.84 Gy	6/50	12.0
SO+2.84 Gy	7/46	15.2
2.84 Gy+SO	10/47	21.3

性白血病の発症率は低値であった。

CA 膜挿入実験は炎症反応と外科的ストレスとの両者の影響をうける為、外科的ストレスのみで放射線誘発骨髄性白血病の発症率が増加するか否かを検討した。この実験は現在継続中であるが、現在までに得られた結果を、表 3 に示す。外科的ストレスをマウスに与える事により、雄、雌ともに照射のみの群に比較して高頻度で骨髄性白血病を誘発する。現在までのデータでは照射 1 週間前、照射直後にストレスを与えたものの間で発症率の差は認められていない。

#### 4. 討 論

C3H/He 雄マウスの骨髄性白血病の自然発症率は、0.9%であるが放射線 1 回照射により比較的高率に骨髄性白血病が誘発する。更にプレドニンを皮下に 1 回投与する事により 0.47, 1.42, 2.87Gy では白血病の発症は有意に増加したが 4.73Gy 照射では増強効果は認められなかった。プレドニン単独では白血病は発症しないことから、

プレドニンは造血幹細胞の腫瘍性トランスフォーメーションには関与せず、もっぱら **promoter** として働く。また、生理的ホルモンであるコルチコステロンは薬理作用としてはプレドニンと同一のものであるが白血病の増強効果は認められなかった。これはプレドニンは合成製剤であり、一般的に天然ホルモンによりその効果は長い持続時間をもつ為と考えられる。従って、照射1時間前あるいは24時間後にプレドニンを投与しても、照射直後投与した群と発症率の差が認められなかった結果とも一致する。

この様なプレドニンの白血病発症における増強効果の機構については次の二つの可能性が考えられる。まず第1の可能性は、図4と5に示す様にプレドニン投与動物では感染自体の増強と抵抗力の減弱という二つの面から、非投与動物より強くかつ長い菌血症症状が続き、従ってより強い顆粒球系増殖刺激を巻き起こす事が予想される。これに沿って考えられたモデルを図9に示す。一段目に並ぶ正方形は白血病誘発に関与する造血幹細胞のコンパートメントである。照射された幹細胞中には、線量に応じて腫瘍性トランスフォーメーションを起こした幹細胞（点を打った部分）が増加する。しかし線量の増加と共に殺される幹細胞も増加する（斜線の部分）。造血組織中では、死んだ幹細胞は直ちにマクロファージにより処理され、その空隙はより上位の幹細胞プールからの流入

入により埋められる。これが第二段である。一方幹細胞に対する増殖刺激は線量が高い程、換言すれば造血組織の崩壊が高度な程強まる筈である。図の階段状の黒い部分がこれを示している。この増殖刺激により幹細胞の白血病化が定着するのであるが、3Gy 以下ではその刺激は充分でなく、初発を受けた幹細胞の一部は発症することなく止まっている。5Gy では刺激は充分の強さであって、初発を受けたすべての幹細胞が白血病化するがその総数は 3Gy の場合より低い（黒く塗りつぶした部分）。このモデルは一応実験結果に適合するように思われた。しかし、照射後の幹細胞の回復動態を検索すると、プレドニン投与群の方が照射のみの群より、より早く回復するデータは得られなかった。むしろ 10d-CFU<sub>s</sub> の回復は、プレドニン投与により大幅に遅延した。又、最近 Janice 等によってグルココルチコイドはT細胞が産生するインターロイキンⅢを mRVA レベルあるい蛋白レベルの発現に抑制的に働くと報告している。この結果は in vitro の結果であるので我々も in vivo で同様な事が生ずるか否か検索を行なわなければならないが、これは 10d-CFU<sub>s</sub> の回復の遅れを説明するのには充分である。もしそうであるならば、第2の可能性としてプレドニン投与の結果は単なる刺激の増強にあるのではなく、幹細胞の増殖の経時的変動パターンの相違に重要性がある事になる。DNA 損傷を受けた造血幹細胞がその直後から増殖刺激を受ければ、その損傷から回復する事なしに死滅するであろう。しかし増殖刺激のない状態がある期間続けば、損傷の一部は回復可能となり、その後増殖刺激を受けても死滅する事なく白血病へと進展しえることになる。すなわち PLD 回復による前白血病細胞プールの増大である。ただこの仮説によると 4.73Gy 照射における両者の一致の説明がむずかしくなるが、この線量では生き残る幹細胞が極端に少なくなり、多少回復が加わっても影響が出にくい事も予想される。

マウスに炎症反応を起こさせ造血系に刺激を与える目的で CA 膜を挿入する実験を行い、照射後 CA 膜を挿入する事によってプレドニン投与と同様の白血病発症に対する増強効果が認められた。しかしながら、その後の開腹実験はまだ継続中であるが、外科的ストレスのみで白血病発症の増強効果を示唆するデータが出つつある。ストレスは当然個体の内分泌系の変動をまき起こすので、これらの結果はプレドニン投与と同様のメ

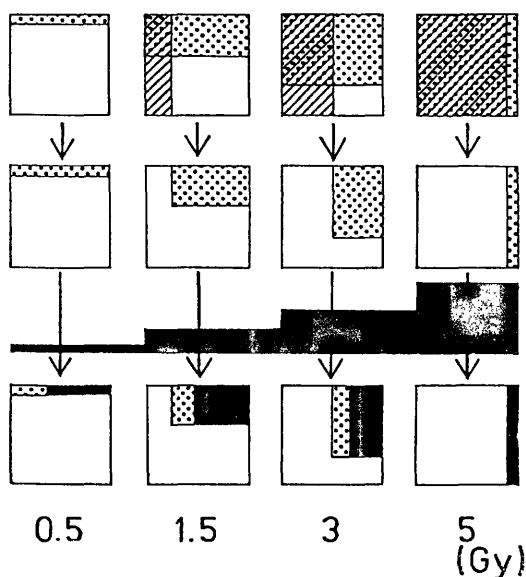


図9. 放射線誘発骨髄性白血病の発症機構

カニズムで白血病発症を増強させている可能性も考えられる。

雌マウスは雄マウスに比べて、照射等の処置により白血病発症の頻度は有意に低値を示した。従って、白血病発症のプロモーションに、性ホルモンが何らかの役割りを演じていると思われる。

以上の事より、照射後の処置により白血病の発症を増加させるメカニズムについては、まだ解明されていないが、これらのメカニズムを解明出来れば、白血病発症のメカニズムの一部が明らかとなる。その結果、照射後の処置により白血病の発症を減少させる事も可能となる。これらの点については、次の特研で継続して行う予定である。

## 実験 2. 放射線で誘発した白血病細胞の特性について

### 2. 研究方法

#### a. 白血病細胞

C3H/He マウスに誘発した骨髓性白血病の約 90% 以上は脾細胞で同系マウスへ移植可能である。移植後、白血病で死亡直前のマウスの脾臓をとり出し、Single cell suspension にし白血病細胞として使用した。

#### b. 白血病性幹細胞の検索

白血病性幹細胞は実験 - 1 で述べた Till & McCulloch の脾コロニー法 (L-CFUs) あるいはメチルセルロース法 (L-CFUc) で検索した。L-CFUc は増殖因子として、L-cell の培養上清、エリスロポエチン、16Gy 照射した同系骨髓細胞も使用した。

#### c. 白血病性幹細胞の放射線感受性について

一定数の白血病細胞を  $\alpha$ -Medium に浮遊させ、0.25Gy から 5.0Gy までの線量で X 線照射し、直ちに L-CFUc と L-CFUs の検索を行なった。

### 3. 結果

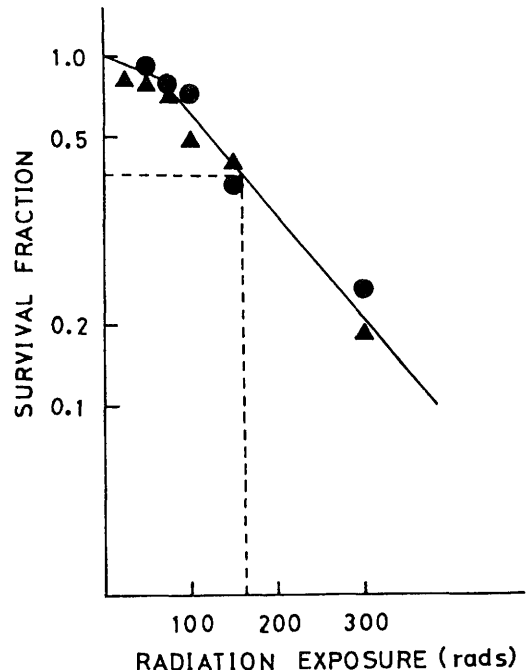
白血病細胞は病理形態学的に大きく 4 種類に分類した (実験 - 1)。そこで骨髓性白血病と分類されたものは更に狭い意味での骨髓性白血病 (顆粒球、単球系統の細胞が白血病化したもの、ここでは Myelomonocytic Leukemia とする)、赤白血病、巨核芽球白血病と形態学的、血液学的検索により分類した。この様に分類した白血病は、in vivo や in vitro でのコロニー形成能で何らかの共通性があるか否か検討した。巨核芽球性 (megakaryoblastic Leukemia) 3 例、赤白血病

表 4 骨髓性白血病のコロニー形成能

LEUKEMIA	LEUKEMIC STEM CELLS IN SPLEEN CELLS		RECOVERY RATE FROM IN VITRO COLONY (%)	
	L-CFUs	L-CFUc St(+) St(-)	L-CFUs	L-CFUc
MEGAKARYOBLASTIC				
8050	+	+	50	92
8057	+	+	100	100
8112	+	+	94	94
ERYTHRO				
7917	+	↑ 1) +	67	50
7920	+	↑ 1) +	55	100
8035	+	+	78	65
8047	+	-	ND	ND
8206	+	+ 2) -	50	17
MYELO-MONOCYTIC				
8042	+	+ 3) -	50	0
8051	+	+	17	11
8083	+	-	ND	ND
8201	+	+ 3) -	33	19
8204	+	+ 3) -	33	21
8207	+	+ 3) -	0	0
8208	+	↑ 3) +	61	22
8209	+	+ 3) -	23	0

NOTE: 1):Erythropoietin 2):EPO+1600 rad irradiated normal mouse bone marrow cells 3):L-Cell conditioned medium or pokeweed mitogen stimulated spleen cell conditioned medium  
: The number of colonies were increased when culture dishes were added adequate stimulators.  
\*Recovery rate from in vitro colony was calculated as follows:  
Number of cases with successful colony formation x 100  
Number of in vitro colonies examined

図10. 白血病性幹細胞 (L-8057) の放射線感受性



● : L-CFUs  
▲ : L-CFUc

(Erythro Leukemia) 5 例、Myelomonocytic Leukemia 8 例について検索した結果を表 4 に示す。巨核芽球性白血病は、in vivo 及び in vitro でもコロニー形成能があり、しかも全例、造血因子に非依存性に in vitro でコロニー形成が認められた。赤白血病と Myelomonocytic Leukemia では in vivo では全例コロニー形成が認められているが、in vitro では、現在造血因子として知られているすべてを使用しても全くコロニー形成が認められないものもあった。又、造血因子に非依存性に増殖するもの、ある程度造血因子に非依存性に増殖するが、造血因子が存在すれば更に増殖するもの、造血因子に完全に依存して増殖する白血病細胞も認められた。

Myelomonocytic Leukemia の 1 例を除いた全例で、in vitro コロニーから L-CFUs と L-CFUc が回収された。

L-8057 の L-CFUs と L-CFUc の放射線感受性について、図 10 に示す。L-CFUs, L-CFUc とともに、ほぼ同一の放射線感受性を示し Do は約 1.96Gy であった。

#### 4. 討 論

骨髄性白血病の特性を検索する目的でコロニー形成能を指標として検討した。巨核芽球性白血病は造血因子に非依存性に増殖する事が認められた。Myelomonocytic あるいは Erythro Leukemia は白血病の種類によってバラバラであり、造血因子に完全に非依存性、一部非依存性、完全に依存性に増殖するもの、全く造血因子に反応せず in vitro では増殖しないものの 4 種類に分類された。in vitro で全く増殖しない白血病でも致死線量照射した脾臓ではコロニー形成が認められるので、未知の造血因子あるいは造血の“場”（造血微小環境）が必要なのであろう。最近、造血因子も遺伝子操作で純粋なものが得られる様になったので、現在、各種造血因子を用いて白血病細胞の増殖能を検索中であるが、同じ Myelomonocytic Leukemia でも GM-CSF に反応しても G-CSF に反応しないとか、白血病細胞によってその反応性は千差万別である。これらの結果により、種々の段階の造血幹細胞が、腫瘍性トランスフォーメーションをおこす標的細胞であり、DNA レベルでもいろいろな場所に損傷がおけると推測される。

正常の造血幹細胞は in vitro コロニーから CFUs を回収する事はこの培養系ではあり得ない

事である。しかしながら検索した白血病のうち 1 例を除いた全例で、L-CFUs が回収された。又、1 例しか検討していないが、L-8057 の L-CFUs と L-CFUc は、ほぼ同一の放射線感受性を示した。これらの事から、L-CFUc の大部分は L-CFUs と、ほぼ同一の分化段階の幹細胞であると考えられる。

#### 5. 結 論

(1) 合成副腎皮質ホルモンであるプレドニソロンアセテートは、放射線誘発骨髄性白血病の発症に対して促進的に働く事が明らかとなった。その増強効果は、0.47, 1.42, 2.84Gy 照射した場合に認められたが、4.73Gy 照射では認められなかった。

(2) 生理的副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドは、白血病発症に対する増強効果は認められなかった。これは両薬剤の投与後の持続効果の差によるものと考えられる。

(3) 炎症反応と外科的ストレスは、放射線誘発骨髄性白血病に対して促進的に働く事が明らかとなった。

(4) マウスの骨髄性白血病細胞は、造血因子の反応性からみて、非依存性、一部非依存性、依存性に増殖するもの、全く造血因子に反応せず in vivo では増殖しないものの 4 種類に分類された。

#### 〔謝 辞〕

本研究の遂行では、すぐれた実験動物の供給、良好な管理なくしては不可能であった。これらの業務に携わった動植物管理課の皆様に厚く感謝いたします。

又、実験動物の飼育管理にあたられた歴代の研究補助の方々にも深謝いたします。

#### 〔研究発表〕

- 1) Yoshida, K. and Seki, M. : Leukemia and hematopoietic microenvironments. *Recent Advances in RES Reseach*, **25**, 63-71, 1985.
- 2) Yoshida, K., Nemoto, K., Nishimura, M., Hayata, I., Inoue, T. and Seki, M. : Nature of leukemic stem cells in murine myelogenous leukemia. *Int. J. of Cell Cloning*, **4**, 91-102, 1986.

- 3) 関 正利：放射線発癌における内分泌的要因。  
放医研シンポジウム、シリーズ No. 17,  
142-150, 1986.
- 4) Yoshida, K., Seki, M., Hayata, I., Niwa,  
O., Tadokoro, K. and Tada, N. : Myelo-  
proliferative disorder due to abnormal  
production of hematopoietic stimulators.  
*Leuk. Res.*, **11**, 621-627, 1987.
- 5) Hayata, I., Yoshida, K., Ichikawa, T.,  
Hirono, Y. and Seki, M. : Cytogenetical  
study on new myeloproliferative disorder,  
L-8313, found in the irradiated mouse.  
*Proc. Japan Acad.*, **63**, 13-16, 1987.
- 6) 関 正利：放射線発癌における個体レベルの  
問題点。  
現代病理学大系, 中山書店 P228-236,  
1984.
- 7) Yoshida, K., Seki, M., Maeda, M., Fujita,  
J. and Tadokoro, K. : Production of in-  
terleukin-3 from a T-cell neoplasm.  
*Leuk. Res.* **12**, 731-736, 1988.

## 5. 放射線誘発白血病の発生機序に関する細胞動態学的研究

中 尾 恵, 鈴木 元, 川 瀬 淑 子,  
能 勢 正 子, 今 井 康 文 (障害臨床研究部)  
平 嶋 邦 猛, 別 所 正 美 (前障害臨床研究部)

### Cell Kinetic Studies on Radiation Induced Leukemogenesis

Isamu Nakao, Gen Suzuki, Yasufumi Imai, Yoshiko Kawase, Masako Nose,  
Kunitake Hirashima\* and Masami Bessho\*

Division of Radiation Health, \*Division of Radiation Health Former Staffs

In order to elucidate the radiation induced leukemogenesis, the clonal origin of radiation induced thymic lymphoma was studied in mice with cellular mosaicism for phosphoglycerate kinase. Repeated whole-body X irradiations resulted in development of thymic lymphomas in the mosaic mice. Phosphoglycerate kinase from all lymphomas gave only a single spot on electrophoresis. The results demonstrate the single cell origin of the thymic lymphoma.

We have demonstrated that both incidence of radiation induced myeloid leukemia and of radiation induced thymic lymphoma in RFM mice increase in dose dependent fashion. Moreover, a mean latent period of mice suffered from myeloid leukemia and thymic lymphoma after irradiation became shorter in groups received higher doses of radiation. It is known that the onset times for high dose leukemia cases in young generation are significantly earlier than that for low dose leukemia cases in A-bomb survivors. These results relating to the effect of radiation dose on latent period of myeloid leukemia and thymic lymphoma in RFM mice apparently support above view.

It is suspected that radiation induced leukemogenesis is not a simple event, i.e. activation or disregulation of a critical gene, but rather is mixed events. Irradiation may alter multiple gene function in the progenitor cells of leukemic cells or it may alter the function of stroma cells that is important for natural hemopoiesis. Moreover, irradiation impairs immune system at the same time, which may result in escape of preleukemic cells from immune surveillance mechanism. So, 3 Gy irradiated RFM mice were injected with human recombinant IL-2 (hrIL-2). Upon administration of hrIL-2, mean survival period of thymoma bearing mice became shorter than those of control mice. Although, hrIL-2 failed to increase an overall incidence of thymoma. Therefore, it is suggested that hrIL-2 shortens the promotion step of thymoma. On the other hand, administration of hrIL-2 failed to alter the incidence of myeloid leukemia or the mean survival period of mice bearing myeloid leukemia, indicating that our protocol of IL-2 administration was not good enough to alter the myeloid leukemogenesis.

#### 1. 緒 言

被曝者集団の白血病発生率が2年後より増加

し、5～8年後にピークに達することから、放射線がヒトの白血病を誘発することが疫学的に証明されてきた<sup>1)</sup>。しかし、放射線誘発白血病の発生

機序は、なお十分明らかではない。本研究に於いては、次の3項目について検討を行った。a. 放射線で誘発される白血病が多細胞起源であるか、単一細胞起源であるか、すなわち、白血病細胞化する標的細胞の起源についてである。骨髄性白血病の他、造血器腫瘍に於いて、女性患者の腫瘍細胞に G6PD isoenzyme A・B の何れか一方の isoenzyme しか存在しないことが証明され<sup>2)</sup>、同様にマウスに於いても X 染色体にリンクする酵素、PGK (phosphoglycerate kinase) A・B の isoenzyme が、3-methylcholanthrene 誘発線維肉腫<sup>3)</sup>、特発性<sup>4)</sup>、及びウイルス誘発性リンパ腫<sup>5)</sup>、N-butyl-N-(4-Hydroxybutyl) nitrosamine 誘発膀胱癌では、何れか一方の isoenzyme しか存在せず、単一細胞起源であることが報告されている。しかし、放射線誘発白血病ないし造血器腫瘍が単一細胞起源であるか否かについては明らかではない。そこで、PGK モザイクマウスを用いて放射線誘発胸腺リンパ腫の単一細胞起源について検討した。b. 放射線誘発骨髄性白血病の発生率、ことに潜伏期に線量依存性が認められるか否か、広島、長崎の原爆被曝者に於いて、急性白血病発生は、若年層では同年令層の特発性白血病発生よりも早期に現れているが<sup>9)</sup>、線量が放射線誘発白血病の潜伏期間に影響するの否かは明確ではない。そこで放射線誘発骨髄性白血病の好発系である RFM/MsNrs 系マウスを用い、3.0Gy 以下の中間線量域の骨髄性白血病と胸腺リンパ腫の発生率と潜伏期の線量依存性を検討した。c. 放射線誘発白血病発生の変更因子として、Conditioned medium (CM) を含め造血刺激因子 (CSF) 及び Cytokine、ことに Interleukin-2 (IL-2) の影響を検索した。これには、放射線誘発 RFM 系マウス骨髄性白血病 Cell line に対する CSF の増殖刺激と分化誘導を、また照射マウスに於いて、IL-2 投与による T 細胞増殖を介する免疫監視機構の強化を予想し、造血器腫瘍の発生率、潜伏期、生存期間を検討した。

## 2. 研究方法

a. C3H/He 系の正常雌マウスは、PGK 遺伝子の Pgk-1<sup>b</sup> を有するが、これに突然変異の Pgk-1<sup>a</sup> を有する C3H/He 雄マウスを交配して、PGKA 型と B 型の 2 種類の体細胞からなるモザイクマウス (Pgk-1<sup>a</sup>/Pgk-1<sup>b</sup>) を作製した。1.7Gy (島津信愛Ⅲ、200kVp, 20ma) の 7 日間隔の 4 回照射を行い、1 群は、Urethan 1mg/g

体重の麻酔を付加した。PGKassay は、腫瘍組織の細胞浮遊液を澱粉ゲル上にアプライして電気泳動し、Isozyme pattern を観察した。

b. 生後 9-10 週の放医研自繁の RFM/MsNrs 系雄マウスに、各々 3.0Gy (152匹)、1.5Gy (86匹)、1.0Gy (125匹)、0.5Gy (127匹) に、X 線 (200kV, 20mA, 0.5 mm Cu+0.5 mm Al, 60-65R/min, FSD50 cm の条件) を全身 1 回照射し、非照射マウス 115 匹を対照とし、CV 条件下で 2 年間観察した。発症したマウスは、死亡直前または直後に解剖し、サイトスピンによる骨髄、脾細胞の標本、病理組織標本、血算等により診断、分類し、各線量に於ける発生率と潜伏期を求めた。

c. 細胞は、RFM 系マウスに 3.0Gy の X 線照射後誘発された骨髄性白血病の脾細胞から Cell line を株化した M3B、一部実験では M5 を用いた。M3B は、染色体 2q<sup>-</sup>、形態上は骨髄芽球様で、α-NB 染色 5% 陽性、極く一部で単球様形態を示す。さらに、L 細胞 CM によるコロニー増殖刺激と抑制刺激が最も顕著に表現される clone, M3BJB1 を樹立し、増殖刺激と分化誘導について検討した。CSF 源による増殖刺激は、コロニー形成刺激能、及び液体培養系での増殖細胞数算定によった。分化誘導能は、液体培養系での形態的变化 (M-G 染色、esterase 二重染色)、Latex 粒子貪食能及び培養細胞のコロニー形成率の低下を指標とした。次に、同様の白血病脾細胞株、M5 を用いて宿主の腫瘍抵抗性の有無を検討した。限界希釈列の M5 細胞を、それぞれ RFM マウスに静注し、さらに生残マウスが M5 細胞に対して免疫応答するか否かを検討した。脾 T 細胞を調整し、50Gy の放射線照射で不活性化した M5 細胞と混合培養し、免疫応答の存在が示唆されたので、RFM マウス 100 匹に 3.0Gy 照射後、前白血病細胞の出現時期及び免疫能の回復時期と目される 3 週-6 週に、隔日に 10 日間、ヒト・リコンビナント IL-2 (hrIL-2、塩野義より供与)、5×10<sup>4</sup>unit/匹を腹腔内投与し、対照として、3.0Gy 照射 RFM マウス 100 匹には、ヒト・アルブミン PBS 溶液を投与し、骨髄性白血病と胸腺リンパ腫の発生率、潜伏期、生存期間を検討した。

## 3. 結果

a. 正常胸腺は、PGK, A・B の両型が認められたが、誘発胸腺リンパ腫は、只、単一のスポ

表1 放射線誘発胸腺リンパ腫の PGK 型

- a. 39匹を全身X線照射、7日間隔で1.7Gyを4回  
b. 43匹をウレタン麻酔下に同様の照射を施行

Experiments	Number of thymic lymphomas	PGK type		
		A	B	A+B
1.7 Gy × 4 <sup>a)</sup>	9	8	1	0
(1.7 Gy+U) × 4 <sup>b)</sup>	12	10	2	0

ットのみが認められた。21例の胸腺リンパ腫のPGK型は、表1に示すように、A型またはB型の何れかを示し、A+B型を示したものはなかった。以上から放射線誘発胸腺リンパ腫は、単一細胞起源であることが証明された。なお、CSF産生腫瘍移植により、末梢血に増加した顆粒球のPGK assayでは、すべてA・B両型を示したことから、CSF産生腫瘍により反応性に増加した顆粒球は、単一細胞起源ではないことが明らかとなった。

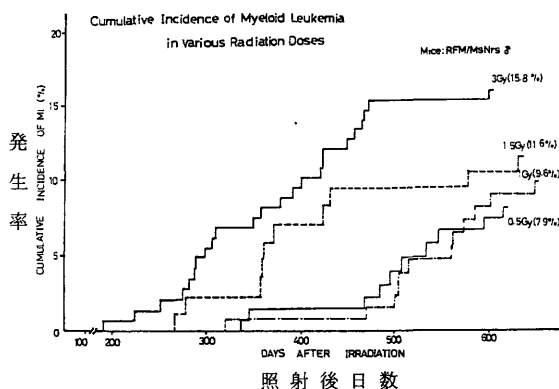


図1 各照射線量に於ける骨髄性白血病の発生率

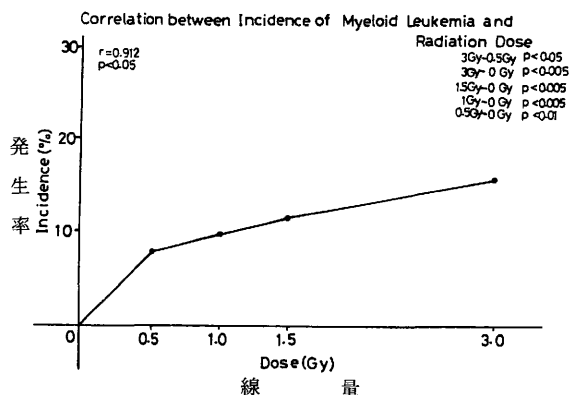


図2 照射線量と骨髄性白血病発生率との相関

表2 放射線誘発骨髄性白血病の線量による潜伏期の差異

線量 Radiation Dose(Gy)	匹数 Mice	発生率 Incidence of Myeloid Leukemia(%)	潜伏期 Latent Period(Days)	
			平均 x̄	SD
(1) 3.0	24/152	15.8	387	± 96
(2) 1.5	10/ 86	11.6	406	± 113
(3) 1.0	12/125	9.6	531	± 81
(4) 0.5	10/127	7.9	494	± 88
(5) 0	0/115	0.0		

(1)-(4) P<0.05 in a  $\chi^2$  test (Incidence)  
(1)-(5) P<0.005  
(2)-(5) P<0.005  
(3)-(5) P<0.005  
(4)-(5) P<0.01

(1)-(2) P<0.05 in a generalized Wilcoxon test (Latent Period)  
(1)-(3) P<0.005  
(1)-(4) P<0.005  
(2)-(3) P<0.05

Correlation between Latent Period of Myeloid Leukemia and Radiation Dose

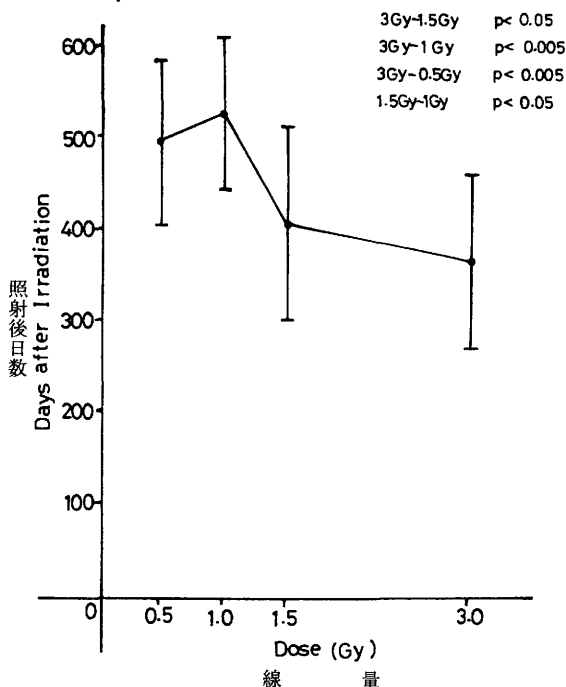


図3 照射線量と骨髄性白血病潜伏期との相関

b. 骨髄性白血病の発生率は、3.0Gy照射群では15.8%、1.5Gy群、11.6%、1.0Gy群、9.6%、0.5Gy群、7.9%、対照群、0%（図1）であり、3.0Gyと各群間、各線量群と対照群間に有意差があり、線量と発生率との相関（ $r=0.912$ ）を示した。（図2）。潜伏期は、3.0Gy群、190-603日、1.5Gy群、266-634日、1.0Gy群、320-654日、0.5Gy群、337-618日であり、発症時期は、3.0Gy群が最も早く、次いで、1.5Gy、1.0Gy、0.5Gyの順に発症した。検定上は、3.0Gyと各線

量群間、及び 1.5Gy 群と 1.0Gy 群間にも有意差が認められ、高線量群に潜伏期の短縮が見られ、線量依存性を示した (表 2、図 3)。胸腺リンパ腫の発生率は、3.0Gy 群、27.6%、1.5Gy 群、15.1%、1.0Gy 群、10.4%、0.5Gy 群、6.3%、対照群、9.6% であり、3.0Gy 群と各線量群間、1.5Gy 群と 0.5Gy 群間に有意差が認められた、検定上、1.0Gy 群以下の群間に有意差はなく、骨髓性白血病では、0.5Gy が誘発の閾値線量であるのに比較して、より高線量の 1.5Gy が閾値線量と認められる。胸腺リンパ腫の潜伏期は、3.0Gy 群、55-490日、1.5Gy 群、101-520日、1.0Gy 群、115-645日、0.5Gy 群、338-598日、対照群、249-702日であり、発症時期は、3.0Gy 群が最も早く、次いで 1.5Gy、1.0Gy、0Gy、0.5Gy の順に発症した。検定上、3.0Gy 群と、1.0及び 0.5Gy 群間、1.5Gy 群と 0.5Gy 群間、1.0Gy 群と 0Gy 群間に有意差が認められ (表 3)、線量依存性を示した。

c. 親株 M3B に対し、LCM は、低濃度 (10

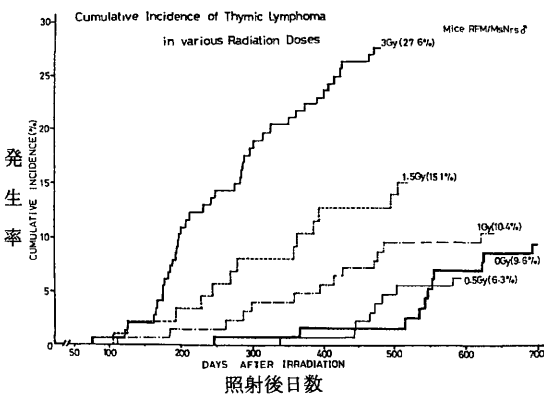


図 4 各照射線量に於ける胸腺リンパ腫の発生率

表 3 放射線誘発胸腺リンパ腫の線量による潜伏期の差異

線量	匹数	発生率	潜伏期
Radiation Dose(Gy)	Mice	Incidence of Thymic Lymphoma(%)	Latent Period(Days)
(1) 3.0	42/152	27.6	267 ± 102
(2) 1.5	13/ 86	15.1	303 ± 122
(3) 1.0	13/125	10.4	369 ± 133
(4) 0.5	8/127	6.3	466 ± 64
(5) 0	11/115	9.6	527 ± 118

(1)-(2) $P < 0.05$	in a $\chi^2$ test (Incidence)	(1)-(3) $P < 0.025$	in a generalized Wilcoxon test (Latent Period)
(1)-(3) $P < 0.005$		(1)-(4) $P < 0.005$	
(1)-(4) $P < 0.005$		(1)-(5) $P < 0.005$	
(1)-(5) $P < 0.005$		(2)-(4) $P < 0.025$	
(2)-(5) $P < 0.05$		(2)-(5) $P < 0.05$	

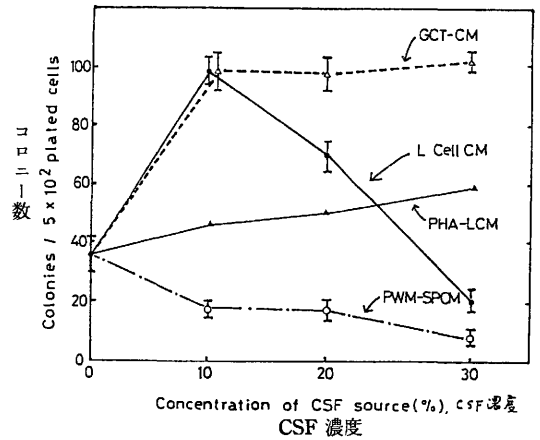


図 5 各種 CM の放射線誘発白血病細胞 M3B に対する増殖刺激

%) にて増殖刺激、高濃度 (30%) にてコロニー形成能の低下傾向を示した (図 5)。Subclone の JB1 では、この性状はより顕著であった。液体培養系にて、10%LCM 添加では、分化傾向は著明ではなく、増殖刺激を認めたが、30-40% の高濃度添加 2-4 日後には、N/C 比が小さい単球様細胞の増加、 $\alpha$ -NB esterase 陽性細胞の増加、Latex 粒子貪食細胞の増加 (貪食率 40%)、コロニー形成能の低下を認めた。かかる増殖刺激及び分化誘導作用は、M-CSF では認められなかった。コロニー形成細胞の Replating efficiency は、LCM の高濃度では低下した。GCTCM,  $\gamma$ G-CSF, D-factor は、増殖刺激能を有していたが、分化誘導能は明確には認めなかった。(表 4)。以上から LCM は、放射線誘発白血病細胞 clone である M3B 及び JB1 に対し、増殖刺激と単球系への分化誘導作用をもつことが分った。

放射線誘発骨髓性白血病の発生機序に於ける IL-2 の関連性を知るため、10匹の RFM マウスに限界希釈列の 30 コ以上の M5 細胞を静注、全匹が白血病死したが、10 コ以下を投与した 10 匹は生き残った。この生残した RFM マウス脾 T 細胞を、不活性化した M5 細胞と混合培養した結果、加えた M5 細胞の数に応じて脾 T 細胞は増殖応答を示したが、正常 RFM マウス由来の脾 T 細胞は、増殖応答を示さなかった (表 5)。また、M5 細胞を移植し、白血病死直前の脾を放射線で不活性化した後培養すると、上清中に IL-2 活性が認められた。M5 細胞には IL-2 産生能力がないため、培養上清中の IL-2 は、脾に残存し

表4 各種 CM, CSF の放射線誘発骨髄性白血病細胞 M3BJB1 に対する増殖刺激と分化誘導

添加 CM,CSF	細胞増 加比率	貧食能	エステラーゼ 陽性細胞	植えつき後 コロニー生成
Condition	Relative Cell Number (Day 3)	Phagocytic Activity (%) (Day 3)	$\alpha$ -Naphthyl Butyrate Positive (%) (Day 4)	Relative Replating Colony Efficiency (%) (Day 3)
None	1	12 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	100
Lcell CM	10%	1.98 $\pm$ 0.3	20 $\pm$ 6	7 $\pm$ 2
	40%	2.9 $\pm$ 0.3	36 $\pm$ 9	16 $\pm$ 1
Concentrated	5%	1.92 $\pm$ 0.1	32 $\pm$ 6	14 $\pm$ 1
Lcell CM (1%HS, X10)	10%	2.16 $\pm$ 0.2	40 $\pm$ 7	15 $\pm$ 1
GCT CM	10%	1.7 $\pm$ 0.3	11 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1
	40%	1.9 $\pm$ 0.2	16 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1
rG-CSF	100 $\mu$ /ml	2.2 $\pm$ 0.2	12 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
	400 $\mu$ /ml	2.3 $\pm$ 0.1	15 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1
M-CSF	100 $\mu$ /ml	1.0 $\pm$ 0.2	13 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
(Lcell CM)	300 $\mu$ /ml	1.0 $\pm$ 0.2	14 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
D-tector	100 $\mu$ /ml	1.78 $\pm$ 0.2	16 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2
(M1, Ehrlich Tumor)	500 $\mu$ /ml	2.0 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2

表5 放射線誘発白血病細胞M5の移植後に生残したマウス脾T細胞の増殖応答

脾細胞	M5細胞	T細胞増殖
Responder spleen Tcells	M5 cells	Tcell proliferation (cpm)
Normal RFM/MsNrs	0	285 $\pm$ 111
正常マウス	3 $\times$ 10 <sup>5</sup>	346 $\pm$ 133
	1 $\times$ 10 <sup>6</sup>	854 $\pm$ 421
Survived RFM/MsNrs	0	365 $\pm$ 280
生残マウス	3 $\times$ 10 <sup>5</sup>	5778 $\pm$ 244
	1 $\times$ 10 <sup>6</sup>	24521 $\pm$ 731
None	3 $\times$ 10 <sup>5</sup>	335 $\pm$ 61
対照 (加えず)	1 $\times$ 10 <sup>6</sup>	550 $\pm$ 187

白血病細胞M5を移植され、なおかつ生き残った RFM マウスの脾臓の中には、M5細胞に反応して増殖し、IL-2を分泌するT細胞が存在した。

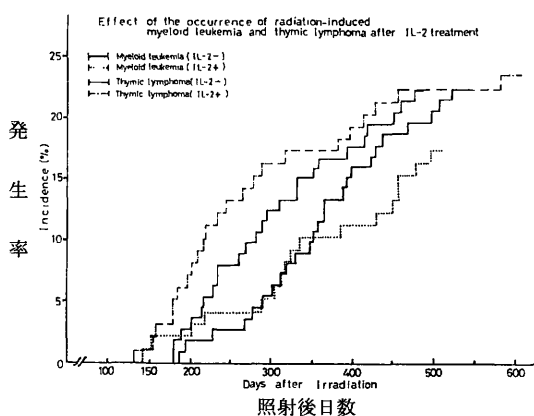


図6 hrIL-2 投与後の放射線誘発骨髄性白血病及び胸腺リンパ腫発生への影響

ていたM5特異的ヘルパーT細胞由来と考えられた。そこで、IL-2を投与して、白血病発生を変更できるか否かを検討したが、結果は、骨髄性白血病の発生率を変えることはなく、白血病発生を変更させる IL-2 投与プロトコールに問題を残した。一方、同時に観察した胸腺リンパ腫では、発生率は非投与群と有意差はないが、投与群に生存期間の短縮、潜伏期の短縮が見られた(図6)。

## 4. 討 論

a. 放射線誘発胸腺リンパ腫が、単一細胞起源であることが立証されたが、本実験では、PGK, A型胸腺リンパ腫がB型よりも高頻度に発生した。これはA、Bの表現型の imbalance が、X染色体の inactivation の nonrandomness<sup>7)</sup>に帰因することが考えられる。マウスの放射線誘発白血病の発生が、Urethan により増大するとの報告<sup>8)</sup>があるが、自験では有意な増加は見られず、その理由としては、マウスの strain と、照射線量の差によるのかも知れない。

b. 被曝者の放射線誘発白血病は、特発性白血病の発生分布とは異なり、単峰の最頻値分布をとる。また、発生ピークは、慢性骨髄性白血病では被曝時年齢に関係なく、5-10年の間に位置するが、急性白血病のそれは、これよりも遅く、被曝時年齢が進むとともにピークは鈍くなっている<sup>10)</sup>。高線量白血病例(100rad以上)の発症は、低線量白血病例よりも有意に早い、それも0-9才、10-19才の被曝時年齢層のみに潜伏期の短縮が見られ、慢性骨髄性白血病例では、20-34才の被曝時年齢層に限り、短縮が見られている<sup>9)</sup>。従って、吸収線量と潜伏期の間に逆相関関係が成り立つように思われるが、なお以上の様に明確ではない。本実験では、同週令のマウスを用いて年齢要因を除外し、骨髄性白血病と胸腺リンパ腫に於いて、線量依存性に潜伏期が短縮することを明らかにした。

c. 放射線誘発白血病の発生機序には、白血病細胞の増殖と分化過程がかかわると考えられる。CMによるコロニー増殖刺激と抑制刺激が顕著に表現される樹立株、M3BJB1 clone が、LCMに対し、増殖と単球系への分化を示すことを明らかにした。すなわち、L細胞の培養上清中には、増殖刺激の他に、分化を誘導する物質の存在が判明し、今後分化誘導物質の同定が、白血病治療薬としての可能性を含め、課題であると考えられる。次に、腫瘍発生の変更要因と予想された IL-2 を、

白血病誘発をかけた RFM マウスに投与したが、骨髓性白血病の発生率や生存期間を変えることはなかった。これは、白血病発生を変更させる IL-2 投与プロトコルの設定が適切でなかったとの条件を留保した。IL-2 投与は、放射線誘発白血病発生の promotion 段階に対し、2 面性を以て関与すると考えられる。その 1 は、IL-2 は、前胸腺細胞の clonal expansion を誘導して、照射マウスの免疫系を早期に回復させ、前白血病細胞に対して免疫監視を強化するであろうこと、その 2 は、前胸腺腫細胞の増殖を促進するかも知れないことである。本実験の胸腺リンパ腫は、発生率は非投与群と有意差はないが、投与群に生存期間の短縮と潜伏期の短縮が見られており、IL-2 が胸腺リンパ腫の promotion 段階を短縮することが示唆された。すなわち、IL-2 は、前胸腺リンパ腫細胞の増殖を促進するのかも知れない。

## 5. 結 論

(1) マウスの放射線誘発胸腺リンパ腫は単一細胞起源であることが証明された。

(2) 放射線誘発骨髓性白血病と胸腺リンパ腫は、RFM 系マウスに於いて、発生率と潜伏期が線量依存性に、それぞれ増加ならびに短縮することを明らかにした。

(3) 放射線誘発骨髓性白血病細胞から、CM によるコロニー増殖刺激と抑制刺激が最も顕著に表現される M3JB1clone を樹立し、これを用いることにより、L 細胞 CM 中には、増殖刺激をする物質の他に、分化を誘導する物質が存在することを明らかにした。

(4) 放射線誘発骨髓性白血病 clone 投与マウスの脾に clone 細胞由来の特異的ヘルパー T 細胞が IL-2 を産生し、免疫応答が示されたので、IL-2 を放射線で白血病誘発をかけた RFM マウスに投与したが、骨髓性白血病の発生率を変えることはなかった。しかし、胸腺リンパ腫は、投与群に生存期間の短縮と潜伏期の短縮が見られ、IL-2 が胸腺リンパ腫の promotion 段階を短縮することが示唆された。すなわち、IL-2 は、前胸腺リンパ腫細胞の増殖を促進するのかも知れない。

## 〔参考文献〕

1. Ionizing Radiation ; Level and effects. A report of the United Nations Scientific Committee on the effects of atomic radiation to the general assembly with annexes, Vol. 11. United Nations, New York, p.408, 1972.
2. Fialkow, P. J.: Clonal origin of human tumors. *Biochim. Biophys. Acta*, **458**, 283-321, 1976.
3. Tanooka, H., Tanaka, K.: Evidence for single cell origin of 3-methyl cholanthrene induced fibrosarcoma in mice with cellular mosaicism. *Cancer Res.*, **42**, 1856-1858, 1982.
4. Collins, S. j. Fialkow, P. J.: Clonal nature of spontaneous AKR leukemia. *Int. J. Cancer*, **29**, 673-676, 1982.
5. Reddy, A. L. Fialkow, P. J.: Clonal development of lymphoma induced by Rausher leukemia virus. *Int. J. Cancer*, **31**, 107-109, 1983.
6. Kakizoe, T. Tanooka, H. Tanaka, K. Sugimura, T.: Single-cell origin of bladder cancer induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in mice with cellular mosaicism. *Gann*, **74**, 462-465, 1983.
7. Johnstone, P. G. Cattanaach, B. M.: Controlling elements in the mouse IV. Evidence of non-random X-inactivation. *Genet. Res.*, **37**, 151-160, 1981.
8. Kawamoto, S., Ida, N., Kirschbaum, A., Taylor, G.: Urethan and leukemogenesis in mice. *Cancer Res.*, **18**, 725-729, 1958.
9. Land, C. E., Norman, J. E.: Latent period of radiogenic cancers occurring among Japanese A-Bomb survivors. p. 29-47, in ; Late effects of ionizing radiation. Vol. 11, IAEA, Vienna, 1978.
10. Ichimaru, M. et al.: Radiation Effects Research Foundation Technical Report, p. 10-76, Hiroshima, 1976.
11. Genetic and somatic effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, p. 176, 1986.

## 〔研究発表〕

- 1) Bessho M., Jinnai, I., Hirashima, K., Tanaka, K., Tanooka, H. : Single cell origin of radiation induced thymic lymphoma with Cellular mosaicism. *Gann*, **75**, 792-797, 1984.
- 2) 今井康文、川瀬淑子、能勢正子、中尾 恵 : 放射線誘発 RFM 系マウス骨髄性白血病 cell line, M5 の性状について。第48回日血学会総会、1986. 4.
- 3) 今井康文、川瀬淑子、能勢正子、中尾 恵 : RFM マウス骨髄性白血病 cell line, M3B より得た subclone の増殖と分化についての検討。第49回日血学会総会、1987. 4.
- 4) 川瀬淑子、能勢正子、今井康文、中尾 恵 : 低線量照射域における放射線誘発骨髄性白血病の潜伏期の差異。第30回日本放射線影響学会、1987. 11.
- 5) Moriyama, T., (研究生)、Suzuki, G., Nakao, I. et al. : Induction of anomalous killing activity from antigen-specific CTL clones by adding high dose of human recombinant Interleukin 2. *Cellular Immunology*, **111**, 482-491. 1988.

## 6. 放射線による発がん機構の細胞遺伝学的研究

早 田 勇, 市 川 やよい, 南久松 真 子, 石 原 隆 昭  
(障害基礎研究部)

### Cytogenetical Studies on the Mechanism of Radiation Induced Neoplasms

Isamu Hayata, Yayoi Ichikawa, Masako Minamihisamatsu  
and Takaaki Ishihara  
Division of Radiation Hazards

More than 90% of the radiation induced myeloid leukemias had a consistent chromosomal aberration of the partially deleted No.2 (2q-) in mice (our previous report). In order to know the role of this specific chromosomal aberration in the genesis of tumors, a series of cytogenetical studies were made as follows : a. Identifying the time when the appearance of 2q- could be detected during the genesis of myeloid leukemias in the irradiated mice ; b. Malignancy test of the bone marrow cells with 2q- found before the symptoms of leukemia developed in the irradiated mice ; c. Cytogenetical study of the hematopoietic tissues in mice irradiated by different conditions ; d. Analysis of the oncogenes mapped on No.2 chromosome in normal and leukemic mice ; e. Cytogenetical study of a new myeloproliferative neoplasia, L-8313 ; and f. Karyotype analyses of various tumors.

Following results were obtained by those studies respectively : a. The cells with 2q- could be detected prior to the development of the symptoms of myeloid leukemia in the irradiated mice ; b. The emergence of 2q- was not sufficient to cause malignancy ; c. When the mice were irradiated in the conditions favorable to induce myeloid leukemia (3 Gy, acute whole body irradiation), they had more cells with No.2 chromosome aberration than those irradiated by 4 x 1.7 Gy (conditions favorable to induce lym-

phoid leukemias) ; d. Rearrangement of the DNA segments coding oncogenes such as c-abl and c-src was not detected ; e. In the L-8313 injected host mice dominantly dividing cells in the leukemic spleen were normal host cells introducing a case where the karyotype of a malignant cell could not be prepared by the conventional method of chromosome analysis ; and f. Various chromosomal rearrangements, specific and non-specific to the tumors, were observed.

The process of the genesis of radiation induced mouse myeloid leukemias in terms of the development of 2q- is thought to consist of the following steps. The 2q- is produced by the ionizing radiation in a cell (the chromosomal rearrangement stage). The cell with 2q- proliferates and forms a clone in the hematopoietic tissues damaged by radiation (the preleukemic stage). Secondary change occurs in a cell of the clone, and the cell becomes malignant (the malignant transformation stage). The leukemic cell proliferates and the symptoms of leukemias appear (the leukemic stage). It is suggested that some degree of the radiation injury in the hematopoietic tissue is a prerequisite to the proliferation of the cell with 2q-.

Therefore, the radiation dose that is limited to 2q- production alone in a cell is not sufficient to induce myeloid leukemias in mice.

## 1. 緒言

低線量域における放射線障害の線量効果曲線において閾値があるかどうかということは、放射線生物学において現在最も重視されている研究課題の一つである。低線量域におけるこの閾値の有無の確認を大規模実験により直接行なうことは困難であるが、障害の発生機構が明らかになれば、それを理論的に推定することが可能になる。本研究の第一の目的は、放射線誘発白血病の発生機構を明らかにし、低線量域における放射線障害の線量効果曲線の理論的うらづけの資料を得ることである。

前特別研究（昭和53～57年度）「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の分担課題「放射線による白血病発現機構の細胞遺伝学的研究」により放射線誘発マウス骨髄性白血病には第2番染色体長腕のリジョンCとDにわたる部分を欠失した異常に短い染色体(2q-)が特異的に出現することを明らかにした。この2q-異常は骨髄性白血病マウスの約95%（52例中49例）に出現し、しかも白血病マウスの腫瘍組織におけるすべての白血病細胞に認められることを示唆する結果を得た。この発見は、放射線誘発マウス骨髄性白血病が単一細胞由来性であることを意味するものであり、従って放射線誘発腫瘍には誘発可能線量に低限閾値が存在しない可能性を示唆する重要な意味を持つ。

しかしながら、前特研で得られた成果は主に末期における白血病を解析して得られたものであるため、白血病の成長過程におけるクローン選択の結果、みかけ上単一細胞由来性を示していた可能性を否定することができない。

このような研究の背景から、本特別研究では放射線照射したマウスの造血組織を、主に白血病発症前に細胞遺伝学的に解析するため以下のa～fの実験を行った。

なお、本研究に用いたマウスの血液病理学的所見は生理病理研究部、関正利部長に見ていただいた。

### a. 2q-異常の出現時期の解析

血液病理学的に白血病症状が明白になった時点では骨髄性白血病マウスの造血組織は単一細胞由来の2q-細胞で占められていることが前特研で明らかにされた。この2q-細胞は白血病発症過程においていつから検出可能であるかを追求するため、また2q-細胞の増殖環境を明らかにする

ために、X線照射マウスの造血組織を照射後経時的に細胞遺伝学的に解析した。

b. 白血病発症以前に検出された2q-異常を持つ細胞の腫瘍性検定

C3H/He 若成体雄マウスにX線 3Gy 全身一時照射した場合、骨髄性白血病は照射後約半年経過した後から発症し始め、約1年半後発症頻度が最大となり、2年を過ぎると発症するものは極めて稀になる。最終的には約25%の個体に骨髄性白血病を発症する。また骨髄性白血病細胞を移植すると、早いものは数週間で、遅くとも数ヶ月以内に宿主マウスの血液組織は移植された白血病細胞で満たされ白血病死する。このことから、マウス体内における白血病化した細胞の腫瘍性増殖開始から白血病細胞の数が増え白血病が発症するまでの時間は通常数ヶ月以内と考えられる。

放射線照射により形成された2q-異常を持つ細胞が、即腫瘍性増殖能を持つ細胞であるかどうかを検討する目的で放射線照射後、白血病発症前において検出された2q-細胞の腫瘍性を移植実験により検定した。

c. 異なる照射条件で照射された造血組織の細胞遺伝学的研究

マウスに放射線を照射し腫瘍を誘発させる場合、照射条件の違いにより異なる腫瘍が好発する。たとえば、若成体 C3H/He 雄マウスにX線 3Gy を全身1回照射すると骨髄性白血病が好発（20～30%）し、リンパ性白血病はあまり（数%以下）発症しない。ところが、X線 1.7Gy を4回全身照射（計 6.8Gy）すると、リンパ性白血病が好発（20～30%）し骨髄性白血病はあまり（数%以下）発症しない。異なる照射条件で異なる腫瘍が発症する生物学的背景を明らかにするため、骨髄性白血病の好発照射条件とリンパ性白血病の好発照射条件で照射したマウスの造血組織を細胞遺伝学的に比較解析した。

d. 放射線誘発マウス骨髄性白血病における癌遺伝子の解析

腫瘍特異的染色体異常と癌遺伝子の異常発現が近年論議的になっているが、マウス第2番染色体には2種の癌遺伝子 c-abl と c-src が座位すると報告されている。Meruelo ら (Proc. Natl. Acad. Sci., 1983) は免疫学的方法により c-abl の座はマウス第2番染色体遺伝子地図で Ly11 と H-3 の間であると推定した。この部分は染色体分染によるリジョン C・D・E 付近に相当するため 2q- の欠失部分付近である。ヒト慢性骨髄性

白血病においては c-abl が特異的染色体異常に関与し、異常な RNA が発現していると報告されている。我々は大阪大学微生物研究所、腫瘍ウイルス部門の大和田幸嗣博士の御協力を得て、C3H/He マウスに発症した骨髄性白血病の c-abl と c-src につき分子生物学的に解析した。

e. 新種の造血細胞腫瘍 L8313 の細胞遺伝学的研究

放射線誘発白血病のマウスの染色体解析を行なううち通常の染色体分析法では白血病細胞の分裂像が検出できないものが存在することを見出し、細胞遺伝学的解析を行なった。

f. 各種腫瘍の染色体異常の研究

腫瘍に特異的および非特異的染色体異常を解析し腫瘍性発現における染色体異常の役割につき研究を行なった。

## 2. 研究方法

a. 生後2ヶ月目の雄 C3H/He マウス35個体にX線 3Gy 全身一時照射し、1, 2, 3, 4.5, 5.5, 8, 15ヶ月目に各5個体を犠牲にし、大腿骨より骨髓細胞を得て直接法で処理固定し、in vivo で

分裂中の細胞の染色体標本を作成し、Qバンド染色後50細胞/個体をランダムに写真撮影して核型分析した。

b. 15個体の C3H/He 若成体雄マウスにX線を3Gy 照射し、照射後1, 2, 3ヶ月目にそれぞれ5個体ずつ犠牲にして両後足大腿骨より骨髓細胞を得、個体ごとに2分し、半分を染色体解析、残り半分を移植し、生涯飼育により移植細胞の腫瘍性を検定した。移植には同系雌マウスにX線3Gy (15個体) または9Gy (30個体) を照射した後に1個体の雄マウスから3個体の雌の宿主マウスに等分に移植されるように尾静脈より骨髓細胞を注入した (図1 参照)。移植した細胞が宿主マウスの造血組織で生着し増殖を始めているかどうかを確認するため、照射後2ヶ月の雄骨髓細胞は移植後3ヶ月目に、また、照射後3ヶ月目の雄骨髓細胞は移植後2ヶ月目に各3個体中の1個体を犠牲にして染色体分析により解析した。

c. 22個体ずつの若成体 C3H/He 雄マウスに3Gy または  $4 \times 1.7\text{Gy}$  照射した後3ヶ月以内に各15個体の大腿骨骨髓を摘出し、染色体標本を作成しQバンド法で50細胞/マウス核型分析した。

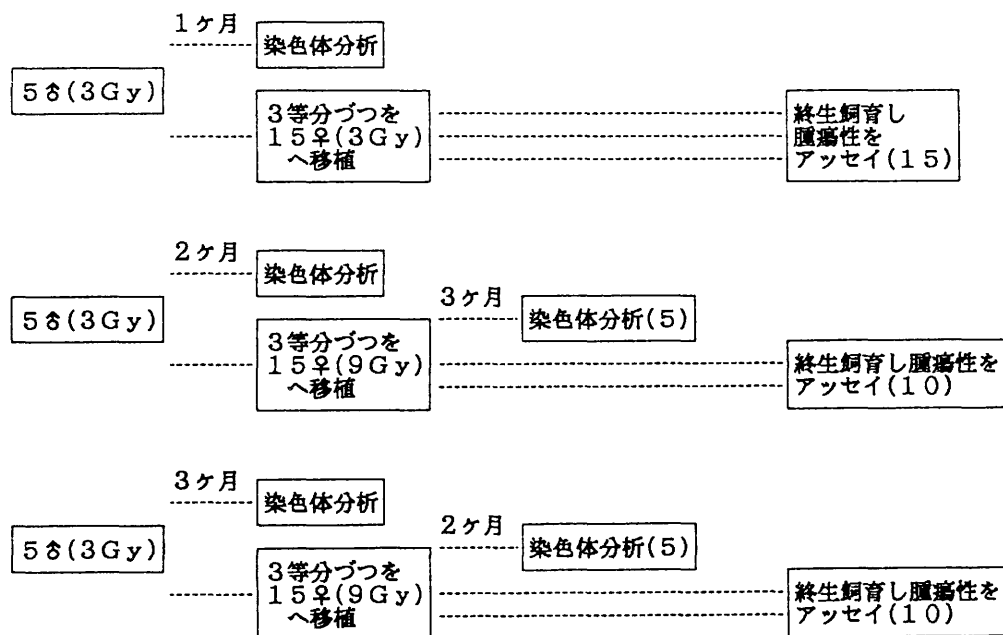


図1. 射線誘発 2q- 放射線誘発 2q- 異常染色体を持つ骨髓細胞の腫瘍性の移植アッセイ方法

残りの7個体ずつのマウスは照射後15ヶ月以上経過した後に同様に染色体標本を作成して解析した。

d. 放射線誘発白血病を発症した原発腫瘍3例(骨髄性白血病2例、B細胞腫瘍1例)および継代移植中の腫瘍7例(骨髄性白血病6例、骨髄巨核球性白血病1例)の脾より細胞浮遊液を作成し、一部を染色体標本用に使用し、残りをDNA抽出用とした。また、コントロールとして正常雄マウスの脾よりDNAを抽出した。抽出したDNAは3種の制限酵素、Bgl II, EcoR I, Hind IIIで切断し、20μgずつアガロースゲルにロードして電気泳動した後サザンブロット法でハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションにはv-abl(pAB3sub3)およびv-src(pSR-A)の2種の癌遺伝子プローブを用いた。

e. 放射線照射雄C3H/Heマウスの腫瘍原発個体の脾組織から単離細胞浮遊液を作成し、一部を染色体標本用に使用し、残りを10%DMSOを含む凍結保存液に浮遊させ凍結保存した。移植実験のため凍結保存細胞を解凍し、5個体の同系雌マウスに尾静脈より静注し、継代1代目腫瘍を得た。継代2代目からは明白に腫瘍化した脾臓から細胞浮遊液を作成し、一部を染色体解析、一部を静注移植するという方法をくりかえし行なった。移植宿主マウスは1代目と2代目に雌、3代目に雄、4代目には雄と雌を用いた。継代1代目では5個体の腫瘍マウスの骨髄細胞と脾細胞から染色体標本を作成し、各50細胞ずつ核型分析した。また、継代1代目の1個体については、さらに脾細胞からナイロン綿カラム法でリンパ球を分離して(生理病理、根本久美恵さんによる)染色体標本を作成し、110細胞核型分析した。この腫瘍がウイルスにより継代されている可能性をテストするため、継代1代目の腫瘍脾を凍結し解凍しPBSを加えて低温で磨潰し、3,000r.p.m.で遠沈し、上澄を0.45ミクロンのミリポアフィルターで濾過し、雌雄5個体ずつの同系マウスに静注し、生涯飼育して白血病発生の有無をテストした。L-8313の培養株は生理病理、吉田和子博士よりいただき通常の方法で染色体標本を作成し50細胞核型分析した。

f. ヒト腫瘍、実験動物腫瘍、培養腫瘍を入手した通常の染色体分染法で核型分析した。

### 3. 結果

a. 表1に示される様に35個体中12個体に2q-細胞が検出された。照射後4.5ヶ月目の個体のう

ち1個体は3種の異なる2q-クロンを保有していたので、2q-クロンは合計14種存在した。照射後15ヶ月目の3個体のうち1個体は50細胞中12細胞(分裂中骨髄細胞の24%)に2q-細胞が認められた。2q-細胞が検出された12個体につき末梢血液および各造血系組織を詳細に検査(生理病理・関正利先生による)した結果、これらのマウスには白血病の徴候は認められなかった。従って、放射線誘発マウス骨髄性白血病に特異的に認められる2q-異常は、白血病症状が発現する以前に細胞遺伝学的に検出可能であることが明らかになった。また、照射後4.5ヶ月目の1個体に認められた様に、放射線により誘発される2q-細胞には多クローン性のものが認められることから、マウス造血組織中で白血病末期までクローンとして残存するのは放射線により誘発された2q-クロンの一部のみである可能性が示された。

2q-異常細胞を含む全染色体異常細胞は分析した1,750(35x50)細胞中832細胞であり、それらは515種類のクローンから成り、515クローン中には合計1,293個の構造異常染色体が認められた。照射後の各時点の分裂中骨髄細胞50細胞における染色体異常細胞の割合および染色体異常クローン

表1 第2番長腕部分欠失異常染色体を持つ細胞の出現

照射後月数	個体数	クローンの大きさ(50細胞中)
1	1	1
2	0	—
3	1	1
4.5	2	1; (6, 1, 1)
5.5	3	6; 3; 1
8	2	1; 1
15	3	7; 7; 12

表2 照射C3H/He雄マウスの骨髄の50細胞中に検出された染色体異常細胞の割合と染色体異常クローン数

照射後月数	染色体異常細胞の割合(%)	染色体異常クローン数
1	42.8±14.6	14.8±4.4
2	43.6±13.2	14.0±2.3
3	41.6±9.2	15.4±4.4
4.5	47.6±12.6	17.6±7.2
5.5	52.4±11.0	13.8±0.8
8	59.2±12.2	15.0±2.7
15	45.6±5.0	12.4±2.6

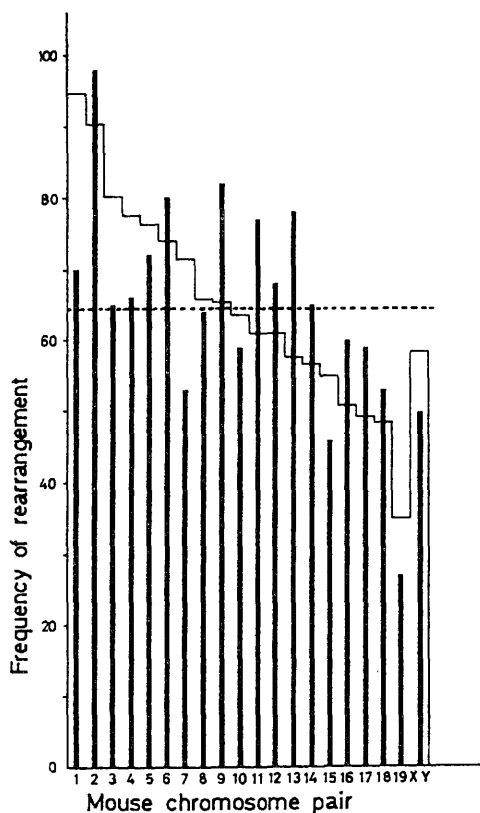


図2 3Gy 照射した C3H/He 雄マウスの骨髓に認められた1, 293個の異常染色体の由来、棒線は実数値、折れ線は染色体長に比例した理論値、点線は平均値

数を表2に示す。染色体異常を示した細胞の絶対数およびそのクローンの種類数は共に個体差が時間経過により生ずる差より大であり、照射後間もない時期のクローン集団の状態が、クローンの選択や進化などによる変更を受けずにそのまま長期間にわたり保たれていることが明らかになった。また、異常染色体1,293個の分染パターンを解析した結果、異常が多くみられた染色体は図2に示される様に、第2番(98個)、第6番(80個)、第9番(83個)、第11番(77個)、第13番(78個)などであった。染色体異常がみられる頻度は、ランダム分布の結果染色体の長さに比例して認められるのではなく、特定の染色体に多く認められた。

b. 移植時の染色体分析および移植後雌宿主マウス中で増殖した雄の骨髓細胞の染色体分析から2q-細胞は15個体中4個体の雄マウスに出現していたことが明らかになった。これら4個体の雄マウス骨髓細胞は12個体(4×3)の雌マウスに移植された。このうち3個体は移植後2または3ヶ月目に染色体検査のために犠牲にしたため、2q-細胞が確実に移植されたと考えられるマウスで生涯飼育ができたのは9個体であった。これら9個体のマウスを含む35個体の照射雄マウスの骨髓細胞を移植された雌マウスを自然死するまで飼育し、雄マウス照射後3ヶ月以内に検出された

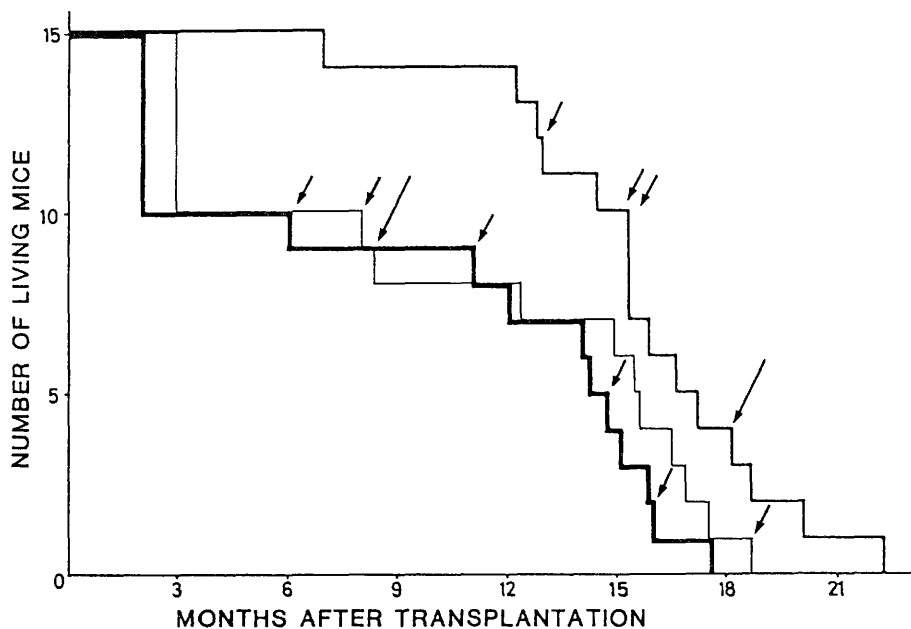


図3 照射骨髓細胞が移植された宿主マウスの生残曲線  
短矢印は 2q- 異常が確認された骨髓細胞が移植された個体、長矢印は白血病を発症した個体の死亡時点

2q- 細胞の腫瘍性増殖能を検定した結果を図3に示す。図3において中太線、細線、太線はそれぞれ照射後1, 2, 3ヶ月目の骨髓細胞が移植されたマウスの生残曲線を表す。短い矢印は2q-異常が確認できた雄マウスから細胞が移植された個体、長い矢印が造血系細胞腫瘍を発症した個体を示す。図から明らかなごとく2q-異常が確認さ

れたマウスの骨髓細胞が移植された個体からは白血病は発症しなかった。造血系細胞腫瘍を発症した2例のうち1例は巨核芽球性白血病、他はリンパ腫であった。染色体分析の結果2q-異常を持つ細胞はこれらの個体からは発見できなかった。この結果は2q-を持つこと、つまりマウスの骨髓性白血病に特異的に出現する染色体異常である

表3 X線3Gyまたは4×1.7Gy照射後早期または晩期における安定型染色体異常を持つ細胞またはクローンの出現

マウス数	X線照射	照射後 月数	観 察 細胞数	染色体異常細胞数		染色体異常クローン数	
				合計	第2番異常	合 計	第2番異常
15	3Gy	< 3	750	320	66***	222**	39
7	3Gy	>15	350	161*	44	88-	19
15	4×1.7Gy	< 3	750	322+	40***++	140**	16
7	4×1.7Gy	>15	350	192**	34**	56-	10

+, ++, -, \*, \*\* & \*\*\* ; 同一マークで印された2群間には統計的有意差が認められる。

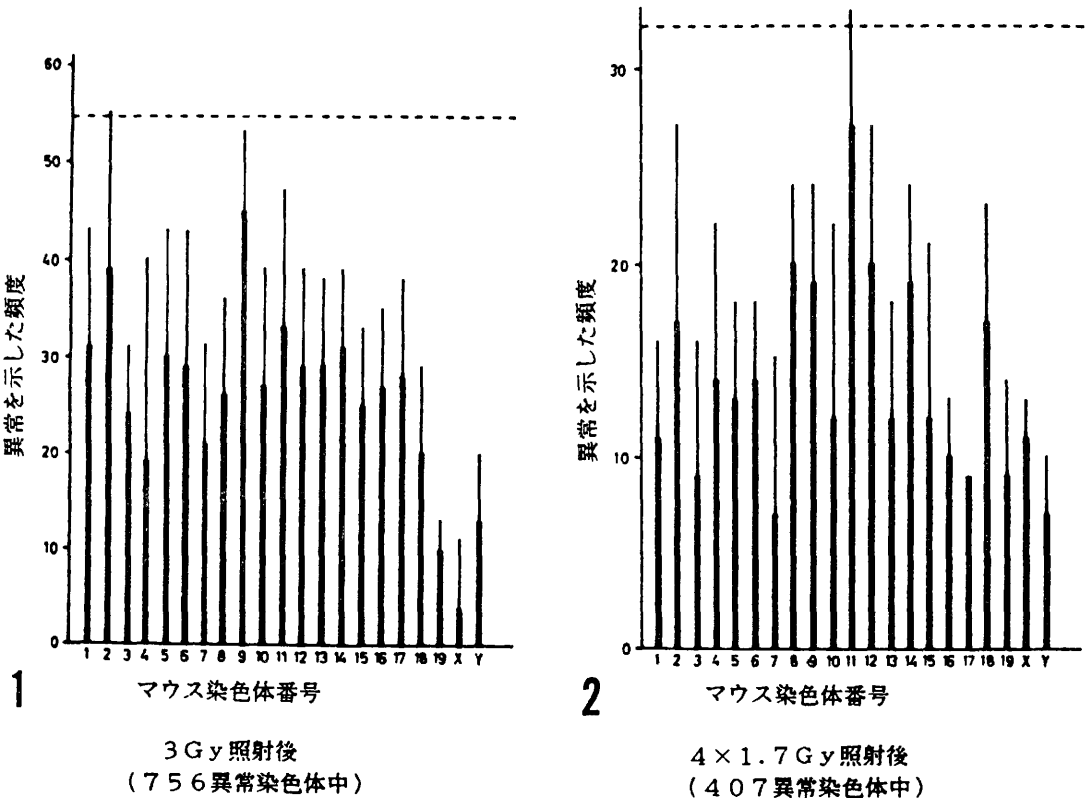


図4 X線3Gy (1)または4×1.7Gy (2)照射したC3H/He雄マウスの骨髓にみられた染色体異常の各染色体における頻度の比較。太棒線は3ヶ月以前、細棒線は15ヶ月以後に検出。点線は平均値+2×標準偏差

第2番染色体のリジョンCとDにわたる部分の欠失が白血病化の十分条件ではないことを示している。

c. 各群における全染色体異常細胞総数、第2番染色体異常を示した細胞数、全染色体異常クロソンの種類総数、第2番染色体異常を示したクロソンの種類数を表3に示す。統計的有意差が認められた2群間には同一マークを付してある。表から明らかなように、照射後3ヶ月以内において両照射法による効果を比較すると、全染色体異常細胞総数(320対322)には差がないが、全染色体異常クロソンの種類数には大きな差があり、3Gy照射群に小さなクロソンが多発していることが明らかになった。また全染色体異常クロソン種類数中の第2番異常クロソンの種類数は両群間で有意差がみられず、第2番異常細胞数には差が認められた。このことは、両群共に染色体異常クロソン中において一定の割合で第2番染色体異常を持つクロソンを含むが、3Gy照射群の方が、クロソンの種類数が多いために絶対値としては第2番染色体細胞数が有意に多くなっていることを示す。

また先の研究aの結果と同様3Gy照射群では時間経過に伴うクロソンの大きさの変化等は認められなかった。4×1.7Gy照射群においては時間経過後全染色体異常細胞総数が増えているが、染色体異常クロソンの種類数は増えていない。これは、4×1.7Gy照射群では時間経過と共に個々の染色体異常クロソンの大きさが増大し、その結果骨髓中における染色体異常を示す細胞の割合が増えていることを示す。

次に3Gy照射群と4×1.7Gy照射群間で各染色体における染色体異常の分布に差異があるかどうかを調べた。3Gy照射群では合計310種類の染色体異常クロソンから756個の異常染色体が発見された。4×1.7Gy照射群では、同様に196クロソンから407個の異常染色体が検出された。図4にこれらの異常染色体がマウスの第何番目のものであるかをバンドパターンから解析し集計してグラフで示した。図において破線は平均値に標準偏差の2倍を加えた値を示す。この値を超えているものは3Gy照射群では第2番染色体、4×1.7Gy照射群では第11番染色体のみであり、それらがそれぞれの群において有意に多く異常が認められた染色体であった。

d. 染色体分析の結果、8例の骨髓性白血病は、欠失部分の大きさが異なる4種(タイプI, II,

III, またはIV、前特研報告書NIRS-M-47, P75参照)の2q-のいずれかを持つ典型的な骨髓性白血病の核型を示すものであった。B細胞腫瘍は核型が正常であった。骨髓巨核球性白血病は、1番、2番、6番、15番、16番、およびY染色体に構造異常を持つ核型を示した。この異常2番は骨髓性白血病のものとは異なり転座による異常であった。これらの腫瘍のDNAを解析した結果、v-ablをプローブとした時、EcoR Iで4本、Bgl IIで2本、Hind IIIで2本、v-srcをプローブとした時、EcoR Iで2本、Bgl IIで1本、Hind IIIで3本のバンドが、いずれのサンプルからも同じ位置に検出された。バンドの濃度については技術的問題により比較困難であった。以上の結果は2q-異常の欠損部分が骨髓性白血病の核型の中に発見できないという染色体バンド分析結果と矛盾しない。

e. 腫瘍原発個体の脾細胞の核型分析結果を表4に示す。表に示される様に25細胞中11細胞は正常核型を示し、14細胞は種々の染色体異常を持つ異常核型を示した。また、25細胞すべてにY染色体が確認出来た。ところが、表5に示される様に継代1代目では移植した全5個体共骨髓および脾に顕著な白血病様症状が認められたにもかかわらずY染色体を持つ移植された雄細胞が認められなかった。継代腫瘍の脾臓中で分裂している細胞の性染色体構成を解析した結果を表6に示す。表から明らかな様に継代白血病マウスの分裂中脾細胞は宿主細胞であることが明らかになった。脾の磨潰し限外濾過液の静注によるウイルス検定実験では10個体の宿主マウスの中に白血病を発症した個体は無かった。吉田和子博士らが樹立に成功したこの腫瘍の培養株の核型を分析した結果、1番、3番、4番、12番染色体に構造異常が認められ、性染色体構成はX1個であった。この核型は原発腫瘍の25細胞中に発見されたいずれのものからも独立したものであった。なお、in vivo および in vitro で継代中の腫瘍は、同系マウスに静注するといずれも同様の白血病症状を発現させるものであった。また、同博士ら(Leukemia Res., 1987)の解析からこの培養細胞はT細胞でありインターロイキンⅢを強く産生することが明らかになった。従って、本腫瘍においては、正常の造血系細胞が腫瘍細胞により刺激されて活発に分裂増殖し白血病症状を発現する新しい腫瘍であり、そのために、通常の染色体解析法では腫瘍細胞本体の核型が検出できないことが明らかになった。

f. ヒトおよび実験動物の腫瘍に出現する特異的および非特異的染色体異常につきデータを集積した。

4. 討 論

ヒトにおいて、特定の染色体部分欠失異常を先天的に持つ患者が特定の組織に悪性腫瘍を発症する例が報告されている。例えば、先天的に第13番染色体の長腕のq14というバンド部位を欠失した

患者は網膜芽細胞腫を発症する (Vogel, Human Genet., 1979)。また、同様に第13番染色体短腕のバンドp13欠失異常を持つ患者は無虹彩をともなった腎芽腫を発症する運命にある (Franche ら, Cytogenet. Cell Genet., 1979)。これらの腫瘍は先天的に染色体欠失異常を持った細胞が特定組織内においてさらに変化することにより腫瘍性が発現されるものと考えられている。放射線誘発マウス骨髄性白血病の2q-異常は上述の実験結果から細胞の腫瘍性発現に先立つ変化であることが示唆される。2q-異常を持つだけでは腫瘍細胞とは言えないが、骨髄細胞は2q-を持つことにより腫瘍細胞に変化し易くなり、何らかの付加要因によってさらに変化したときに初めて腫瘍性が発現されるものと思われる。

特定の染色体異常を持った細胞は特定組織において腫瘍化し易いという現象、および特定の腫瘍に特定の染色体異常が出現するという現象を理解する上で非常に興味深い報告がある。Fransis ら (Leukemia Res., 1984) は、ヒトの骨髄細胞を軟寒天で培養し分化させる実験で、DNA鎖の切断再結合時に必要とされるADPリボシル転移酵素の阻害剤を加えると分化がおこらなくなることを示し、細胞の分化に先立ちDNA鎖の切断再結合がおきる必要があると述べている。この切断再結合はDNAの再配列を意味するものと考えられている。分化を支配する遺伝子の座が転座や欠失等で異常となった細胞が分化能を制限されることは十分に考えられる。また、それぞれの組織においてはその組織の細胞の分化を支配する特有の遺伝子が関与するため、その特有の遺伝子座において切断再結合の誤りに起因する染色体異常がおき易くなることが予想される。事実、Azumi と Sachs (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1977) によれば2q-異常をもつマウス骨髄性白血病細胞は大食球・顆粒球誘導物質で刺激しても反応しないが、第2番染色体が正常な骨髄性白血病細胞は反応し分化することを示し、2q-の欠失部分に骨髄細胞の分化を支配する遺伝子の座があると述べている。また、我々の上述の実験から骨髄性白血病好発照射条件で照射された非白血病マウスの骨髄にみられる染色体異常において第2番染色体に最も高頻度で異常が認められている。従って、腫瘍にみられる特異的染色体異常には細胞の分化に先立つDNAの再配列機構が重要な関連性を持つことが示唆される。

表4 L-8313原発個体の核型分析結果

正常核型	
40, XY	11
異常核型	
40, XY, del 2, inv 5, t (12; 19)	3
40, XY, t (1; 13), t (6; 12)	1
40, XY, t (2; 3; 5; 11)	1
40, XY, t (5; 10)	1
40, XY, t (5; 10), del 6	1
40, XY, t (6; 19)	1
40, XY, del 6, t (15; Y)	1
40, XY, t (8; 11)	1
40, XY, inv 10	1
40, XY, del 12	1
40, XY, t (12; Y)	1
40, XY, del 18	1
合計	25細胞

表5 L-8313造血細胞腫瘍を発症した雄マウスの脾細胞を移植され腫瘍を発症した5個体の雌マウスの造血組織中の分裂細胞の核型分析結果

組織	核型	細胞数
骨髄	40, XX	全250
脾	40, XX	全250
リンパ球	40, XX 39, X, -Y, t (1; 16; 19)	108 2

表6 L-8313腫瘍継代マウスの腫瘍脾細胞中分裂細胞の性染色体構成

継代数	原発	1代目	2代目	3代目	4代目	4代目
宿主の性	雄	雌	雌	雄	雌	雄
腫瘍脾組織中	XX	99	50	1	100	
分裂細胞の	XY	25		199		50
性染色体構成	X	1				

## 5. 結 論

放射線誘発マウス骨髄性白血病の発症過程は以下のように多段階的であると推定される。放射線照射により造血細胞中に 2q- 異常を持つ細胞が誘発され（染色体異常形成期）、放射線障害を受けた造血組織中で増殖しクローンを形成する（前白血病期）。このクローン中の細胞が障害を受けた組織中で 2 次的に変化し、腫瘍性増殖能を獲得した白血病細胞が発生する（白血病発生期）。白血病細胞が増え、白血病が発症する（白血病発症期）。従って、放射線誘発マウス骨髄性白血病は単一細胞由来性を示すが、その誘発線量は単一細胞に 2q- 異常を形成できる線量で十分である（閾値無し）とは単純に結論づけることはできない。

### [研究発表]

- 1) Hayata, I. : Partial deletion of chromosome 2 in radiation-induced myeloid leukemia in mice. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", Ishihara, T. and Sasaki, M. S. eds. *Progress and Topics in Cytogenetics*, **4**, 277-297, 1983.
- 2) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H. and Kubo, E. : Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymoectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy1 congenic donors. *Cancer Res.*, **43**, 3822-3827, 1983.
- 3) Hayata, I. and Dutrillaux, B. : Non-random involvement of rat and mouse chromo-

somes in the stable type chromosomal rearrangements observed in irradiated bone marrow cells. *Proc. Japan Acad.*, **61**, 180-182, 1985.

- 4) Hayata, I. : Leukemogenesis and chromosomal abnormalities. (Proceedings of the XXXXVII General Meeting of the Japan Hematological Society) *Acta Haematol. Jpn.*, **48**, 1857-1863, 1985
- 5) 早田：白血病の発症と染色体異常。放射線科学, **28**, 255-262, 1985.
- 6) Yoshida, K., Nemoto, K., Nishimura, M., Hayata, I., Inoue, T. and Seki, M. : Nature of leukemic stem cells in murine myelogenous leukemia. *Internat. J. Cell Clon.*, **4**, 91-102, 1986.
- 7) Hayata, I., Yoshida, K., Ichikawa, T., Hirano, Y. and Seki, M. : Cytogenetical study on the new myeloproliferative disorder, L-8313, found in the irradiated mouse. *Proc. Japan Acad.*, **63**, 13-16, 1987.
- 8) Yoshida, K., Seki, M., Hayata, I., Niwa, O., Tadokoro, K. and Tada, N. : Myeloproliferative disorder due to abnormal production of hematopoietic stimulators. *Leukemia Res.*, **11**, 621-627, 1987.
- 9) Hayata, I., Ichikawa, T. and Ichikawa, Y. : Specificity in chromosomal abnormalities in mouse bone marrows induced by the difference of the condition of irradiation. *Proc. Japan Acad.*, **63**, 289-292, 1987.

## 7. ゲノムの遺伝的安定性に関する分子生物学的研究

堀 雅 明, 高 橋 永 一, 辻 秀 雄, 辻 さつき  
(遺伝研究部)

### Molecular Biological Study on Genetic Stability of the Genome

Tada-aki Hori, Ei-ichi Takahashi, Hideo Tsuji and Satsuki Tsuji  
Division of Genetics

It has been suggested that fragile sites may act primarily or secondarily in the human genome as predisposing factors for chromosomal instability and may be associated with a variety of clinical manifestations including cancers.

We have conducted a population cytogenetic study of 1022 healthy subjects and 547 cancer patients to determine baseline frequencies of autosomal rare fragile sites. Out of 17 rare autosomal fragile sites defined in HGM9 (1985), the following six were detected; fra(2)(q11), fra(10)(q25), fra(11)(q13), fra(11)(q23), fra(16)(q22) and fra(17)(p12). In addition, we found three new fragile sites; fra(8)(q24.1), fra(11)(p15.1) and fra(16)(p12.1). They are all distamycin A-inducible and located at the junctions of G/R-bands. The overall incidences in healthy subjects and cancer patients appear to be the same, being about 5%. However, analysis of these fragile sites and particular diseases suggests that the distamycin

A-inducible fragile sites may play a role in the etiology of leukemia, myeloproliferative disorders as well as gynecological tumors.

In the present study, we have also examined mechanism of fragile X expression associated with fragile X syndrome in thymidine-prototrophic and auxotrophic human-mouse somatic cell hybrids. In these hybrid cells, both low and high thymidylate stress was found to be effective in inducing fragile X expression, even in a hybrid clone which retained a fragile X chromosome as the only human chromosome. An addition of deoxycytidine completely abolished the effect of high thymidylate stress achieved by excess amounts of thymidine. From these results, we concluded that the expression is an intrinsic property of the fragile site itself and speculated that fragile X mutation arise from chromosomal change in a special class of replicons with polypurine/polypyrimidine DNA sequence.

#### 1. 緒 言

ヒト・ゲノムの遺伝的安定性は細胞複製の正確な制御機構によって維持されている。しかし、この維持機構は必ずしも安定ではなく、種々の内的・外的ストレス要因によって乱れ、遺伝子または染色体レベルの変異・再編成を生じ、細胞の癌化

あるいは遺伝性疾患の原因となっている。最近、ヒト染色体上の遺伝性 fragile site (脆弱部位, FS と略す) がヒト・ゲノムの遺伝的変異性に関わる hot-spot として注目されている。遺伝性 FS とは DNA 代謝活性が低下した条件下で染色体変異を生じやすい特定の染色体領域で、その発現形質はメンデル性相互優性遺伝をする。

X染色体上の遺伝性 FS, fra(X)(q27.3)は脆弱X症候群 (fragile X syndrome) と呼ばれている精神遅滞を伴う遺伝性疾患と密接に関連していることが知られている。常染色体上の遺伝性 FS については、特定の FS が特定の疾病と対応している例はまだ知られていないが、癌、精神遅滞、習慣性流産、奇形、数的あるいは構造的染色体異常などの種々の理由で染色体検査を受診した患者群にその多くが検出されている。また、流死産胎児に観察されるノンランダムな染色体異常や腫瘍細胞にみられる特異的染色体異常の切断点の多くが常染色体上の FS 領域に一致している。これらの状況証拠から遺伝性 FS が種々の疾病障害の遺伝的素因である可能性が示唆されている。

本研究では放射線による発がんや突然変異誘発に関する基礎的研究として、自然発生の遺伝的変異の1つの素因と考えられる遺伝性 FS に着目して、日本人集団 (一般健常人および癌患者) における遺伝性 FS 保因者の検索と FS の発現機構の解析を行った。

## 2. 研究方法

### a. 日本人集団における遺伝性 FS の検索

1) 調査対象: 一般健常人の対象集団は献血者 (1022人; 女: 377, 男: 645) で、平均年令女32才、男31才であった。癌患者集団の調査は白血病および類縁疾患患者のL群 (239人; 女97, 男142; 平均年令47才) と固形腫瘍およびその他の良性腫瘍疾患患者のC群 (308人; 女168, 男140; 平均年令50才) とに分けて行った。

2) 調査方法: 遺伝性 FS の検出には末梢血リンパ球を用いて、HGM8 (国際ヒト遺伝子地図作成会議) で認められている分類 (第1群—葉酸感受性、第2群—ディスタマイシンA誘導性、第3群—BrdU 要求性) に従って次の培養条件下で72時間培養して3群の FS を検索した。(a)葉酸感受性 FS—葉酸およびチミジン不含のHam's F10 メディウム (M-F10) + 5%牛胎児血清 (FCS) + 2%PHA、(b)ディスタマイシンA誘導性 FS および(c) BrdU 要求性 FS—RPMI-1640 メディウム + 10%FCS + 2%PHA。(b)および(c)の処理条件についてはディスタマイシン (50 $\mu$ g/ml) および BrdU (7 $\mu$ g/ml) を細胞固定前最終24時間の処理を行った。無処理区については(b)および(c)と同様 RPMI1640 メディウムを用いた。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5%, 37 $^{\circ}$ C) で72時間の培養後、コルヒチン処理、低張処理

(0.075M KCl)、固定 (エタノール: 酢酸 = 3 : 1)、空気乾燥の手順で標本作製し、ギムザ染色液で染色した。観察細胞数は各検体、各処理区について50細胞である。同一染色体の同一部位に isochromatid gaps or breaks, fragments および triradial 像が細胞あたり4%以上観察された場合、FS と認めた。その詳細な発現頻度を得るため、100細胞を観察した。FS の位置は G-, Q- あるいは R- バンド法により行った。更に、検出された FS について、詳細な発現様式を調べるため次の検出系を用いた。(a)については、i) RPMI1640 + fourordeoxyuridine (FUdR, 6 $\times$ 10<sup>-8</sup>M, 72時間処理)、ii) M-F10 + thymidine (5 $\times$ 10<sup>-5</sup>M, 72時間処理) (6)については、i) Hoechst 33258 ( $\mu$ g/ml)、ii) berenil (150  $\mu$ g/ml)、iii) 4'6-diamido-2-phenylindole (DAPI, 25 $\mu$ g/ml) をディスタマイシンAの代わりに最終24時間処理を行った。

### b. 遺伝性 FS の発現機構の解析

1) 実験材料: ヒト細胞として脆弱X症候群の男性患者由来の繊維芽細胞系統 (RS4729) とリンパ芽球細胞系統 (RGMGL48) および真性多血症 (PV) 患者の末梢血リンパ球を用いた。マウス培養細胞としては、マウス FM3A 細胞より分離されたチミジル酸合成酵素欠損変異株 (FS-thy21, HPRT<sup>-</sup>, APRT<sup>-</sup>) と DNA ポリメラーゼ $\alpha$ 温度感受性変異株 (tsFT20, HPRT<sup>-</sup>) およびマウスのL細胞と FM3A 細胞の TK<sup>-</sup>, APRT<sup>-</sup> 変異株を用いた。

2) 実験方法: 脆弱X症候群と密接に関連しているX染色体上の葉酸感受性 FS, fra(X)(q27.3)、の発現機構を詳細に解析するために、RS4729 のヒト細胞と FS-thy21 および tsFT20 のマウス細胞との体細胞雑種をポリエチレングリコール (MW4000, 50% V/W) による細胞融合法で作成した。また、日本人集団中で高頻度に検出されるディスタマイシンA誘導性 FS, fra(17)(p12)、の発現機構を fra(17)(p12) のホモ接合体である PV 患者由来の末梢血リンパ球とマウスL細胞の TK<sup>-</sup>, APRT<sup>-</sup> 変異株との体細胞雑種を作成して解析した。

## 3. 結果

### a. 日本人集団における遺伝性 FS の検索

日本人集団におけるゲノムの変異性を遺伝性 FS を指標に検討する目的と、遺伝性 FS が染色体変異による発癌機構にどの程度遺伝的素因とし

て関わっているかを検討するために、一般健常人1022人と癌患者547人を対象にFS検査を行った。本調査で検出された常染色体遺伝性FSの種類とその保因者数を図1に示す。これまでに葉酸感受性FSのfra(2)(q11), fra(11)(q13), fra(11)

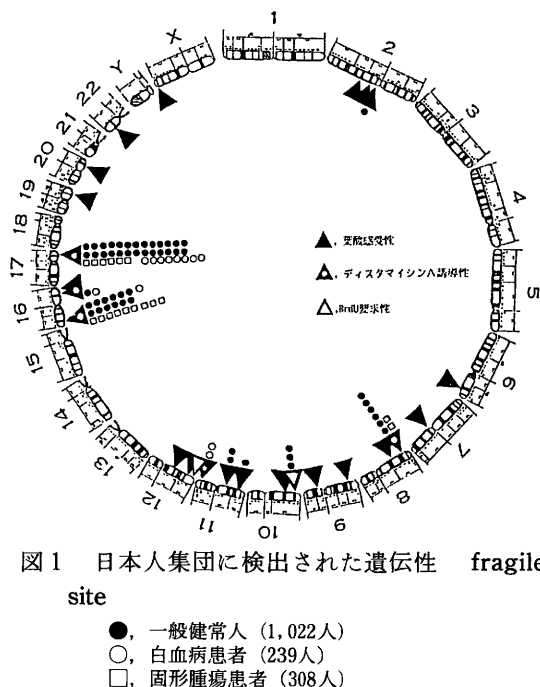


図1 日本人集団に検出された遺伝性 fragile site

(q23)、ディスタマイシンA誘導性FSのfra(16)(q22), fra(17)(p12)と新しい3種類のFS, fra(8)(q24.1), fra(11)(p15.1)およびfra(16)(p12.1)、そして、BrdU要求性FSのfra(10)(q25)、計3群9種類のFS保因者を検出した。一般健常人群における遺伝性FS保因者の全体的な頻度は52/1022 (5.1%)で、日本人集団中で比較的頻度の高いFSはfra(16)(q22) (12/845, 1.4%)とfra(17)(p16) (26/845, 3.1%)であった。

癌患者群に検出されたFSはすべてディスタマイシンA誘導性FSであった。ディスタマイシンA誘導性FSの全体的頻度は一般健常人群で44/845 (5.2%)、白血病患者群で12/239 (5.0%)、そして、固形癌患者群で17/308 (5.5%)であり、集団間で有意な頻度の差は認められなかった。しかし、癌患者集団に検出された個々の遺伝性FSを疾患別に検討してみると次のような興味ある知見が得られた。

(1) まず、L群では白血病類縁疾患に属する

真性多血症(PV)患者群において、fra(17)(p12)の頻度が22%と最も高頻度であった。同じく類縁疾患である骨髓異形成症(MDS)と合わせても10.9%となり、一般集団でのfra(17)(p12)の頻度(3.1%)と比較すると有意に高い( $X^2=9.2$ , d.f.=1,  $P<0.01$ )。しかもPVの1例はホモ保因者であり、これらの疾患とFSとの関連を示唆していると考えられる。

(2) C群では、肺癌群で15.8% (3/19)、婦人科良性疾患群(子宮筋腫、卵巣嚢腫など)で12.1% (4/33)が比較的高頻度であった。

(3) PV症例にみられたfra(17)(p12)のホモ保因者: 18例のPV症例中に3人のfra(17)(p12)の保因者がみつき、そのうちの1例は上述のホモ個体であった。一般集団におけるこのFSの頻度から、ホモが現れる確率はほぼ1/2500であるから、極めて稀な検出といえる。家系調査の結果、この家系が胃癌や食道癌、肝臓癌、脳腫瘍などを多発するいわゆる癌多発家系であることが判明した。

(4) 子宮頸癌患者にみられた重複保因者: 子宮頸癌患者26人のうち一人にfra(16)(q22)とfra(17)(p12)の重複保因者がみつかった。両脆弱部位の一般集団における頻度から、このようなものの現れる確率は1/2200と推定されるので、この例もまた大変稀な症例といえる。

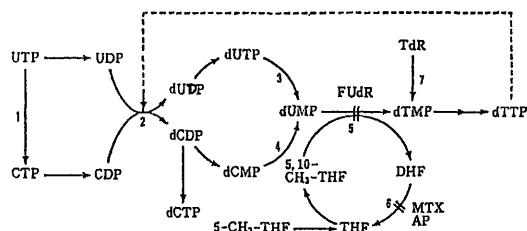
(5) Inv(16)(p13q22)を持つ骨髓単球性白血病患者にみられたfra(16)(q22): 骨髓単球性白血病患者の腫瘍細胞にしばしば16番染色体の逆位inv(16)(p13q22)が観察される。本調査のL群においても3例の症例が含まれていたが、そのうちの1例がfra(16)(q22)保因者であった。FS部位は逆位の切断点(16q22)に一致していた。諸外国からの同様の報告を合すると本症患者28例中18例(64.3%)にfra(16)(q22)の保因者が検出されたことになる。

(6) t(7; 11)(p15-p13; p15)を持つANLLの2例にみられた新しい脆弱部位fra(11)(p15): ANLL-M4の悪性細胞に最近7番と11番染色体の転座が報告されている。本調査対象者のL群の中に本症が2例含まれていた。いずれの症例においても、寛解期の正常細胞において転座の切断点(11p15)に一致したfra(11)(p15)が検出された。

#### b. 遺伝性FSの発現機構の解析

既知の遺伝性FSの大部分(17/26)は第1群の葉酸感受性FSに属する。葉酸感受性FSの発

現条件はすべてチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) の活性を抑えて細胞内の dTTP プールを低下させる条件、いわゆるチミン・ストレスの条件となっている (図2)。葉酸感受性 FS の代表例として fra(X) (q27) の発現を図3に示す。これは精神遅滞を伴う脆弱X症候群由来の体細胞を FudR で処理して TS を阻害し、チミン・ストレスにしたものである。



1: CTP 合成酵素, 2: リボヌクレオチド還元酵素, 3: dUTPase, 4: dCMP デアミナーゼ, 5: チミジル酸合成酵素, 6: ジヒドロ葉酸還元酵素, 7: チミジンキナーゼ, ...→: フィードバック阻害, ◆: 合成阻害, FudR: フルオロデオキシウリジン, MTX: メソトレキセート, AP: アミノプテリン

図2 dTTP と dCTP の生合成経路

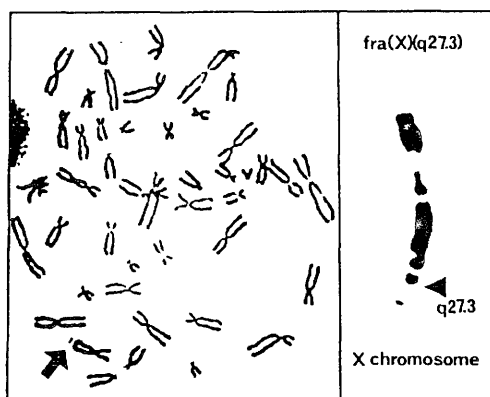


図3 fragile X 症候群男性患者由来細胞での fra(X) (q27.3) の発現

マウス細胞 (FM3A) から分離された TS 欠損変異株 (thy21) はチミジン要求性でチミジン飢餓の条件にさらすと DNA の二重鎖切断による染色体切断を生じて、いわゆるチミン飢餓死 (thymineless death) を起こす。この二重鎖切断はチミジン飢餓処理時に DNA 複製をしていたレプリコン群に特異的に起こり、FS の発現に類似した同位染色体ギャップあるいは double minutes 様の染色体断片を生じる。

(1) ヒト・マウス体細胞雑種での fra(X) (q27.3) の発現

マウス TS 欠損細胞の性質を利用して X 染色体上の葉酸感受性 FS, fra(X) (q27.3) の発現機構を解析した。チミン・ストレスの効果を厳密に検討する戦略として、マウス TS 欠損株細胞と fragile X 染色体をもつ男性患者由来の細胞を融合して雑種細胞を作り、ヒト染色体の部分的脱落後にヒト fragile X 染色体を保持する雑種細胞クローンを分離した。まず、fra(X) (q27.3) がヒト・マウス雑種細胞で発現するか否かを検討した。継代培養の初期に分離された雑種クローンはヒト染色体由来のヒト TS を産生するためチミジン非要求性であった。そのようなクローンについて FudR ( $1 \times 10^{-7}M$ ) 処理をしてチミン・ストレスをかけると fra(X) (q27.3) の発現が確認された。このことは、マウスゲノムの存在は fra(X) (q27.3) の発現を抑制しないことを意味する。上記雑種クローンをさらにチミジン存在下で継代培養していくと染色体の数が減少するが、最終的に fragile X 染色体は保持しながらチミジン要求性を示す雑種細胞 (TS 遺伝子をもつヒト染色体は脱落している) クローンを分離した。雑種細胞の TS 活性を電気泳動的に調べて、チミジン非要求性株はヒト由来の TS 活性を示しているが、チミジン要求性株ではヒト、マウスいずれの活性も検出されないことを確かめた。また、これらの雑種細胞クローンを分離する過程で得られるヒト染色体クローンパネルを利用して、ヒト TS 遺伝子が第18番染色体に座位していることを決定した。

各種細胞系統での fra(X) (q27.3) の発現頻度を表1に示す。第18番染色体を含んだチミジン非要求性の雑種クローン (TFX542) では FudR ( $10^{-7}M$ ) 処理によるチミン・ストレス条件下で FS の発現がみられた。このクローンから第18番染色体が脱落してチミジン要求性となった雑種クローン (TFX543) では、細胞を低濃度のチミジン (TdR,  $1 \times 10^{-7}M$ ; チミジン要求株は正常増殖に  $1 \times 10^{-5}M$  のチミジンを要求する) 存在下で培養することによって、fra(X) (q27.3) の特異的な発現がみられた。この実験により、fra(X) (q27.3) の発現がチミン・ストレス条件に特異的に誘発されることが直接的に示された。従来の阻害剤を用いた結果をより直接的に証明したことになる。

(2) Fragile X 染色体1本のみを保持した雑種細胞の解析

Fragile X 細胞とマウス細胞の DNA ポリメ

表1 低および高チミン、ストレス誘発による fra(X) (q27.3) の発現頻度

Cell	Human x mouse	Human chromosomes retained	Thymidine requirement	Deoxyribo- nucleosides	Concentrations (M)				
					5 x 10 <sup>-8</sup>	1 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>
RGMGL48	fra(X) strain	all	prototrophic	FudR	31	43	-	-	-
				TdR	0	0	0	11	36
				TdR+CdR	-	-	-	0	0
				CdR	-	-	0	0	0
M6-39-11	fra(X) x tsFT20	fraX only	prototrophic	FudR	7	11	-	-	-
				TdR	0	0	0	8	16
				TdR+CdR	-	-	-	0	0
TFX544	fra(X) x thy <sup>-</sup> 21	fraX 18, 1 5, 21 22	prototrophic	FudR	12	16	-	-	-
				TdR	0	0	0	17	26
				TdR+CdR	-	-	-	0	0
TFX543	fra(X) x thy <sup>-</sup> 21	fraX 1, 5 21, 22	auxotrophic	TdR	15	21	0	10	17
				TdR+CdR	-	-	-	0	0
				CdR	-	-	0	0	0

ラーゼ $\alpha$ 温度感受性変異株との体細胞雑種を作成し、その継代培養後にヒト染色体として fragile X 染色体のみが保持されている雑種細胞クローンを分離した。このクローン (M6-39-11) は温度非感受性で、fragile X 染色体上に DNA ポリメラーゼ $\alpha$  遺伝子が座位していることが判った。

温度非感受性であったために、FS 発現に対する DNA ポリメラーゼ $\alpha$  活性の影響を調べることはできなかった。しかし、このクローンにおいても FUDR 処理によるチミン・ストレス条件下で fra(X) (q27.3) の発現が観察された。この雑種細胞の X 染色体はヒト X 染色体 DNA とほとんどがマウス・ゲノム由来のクロマチン・タンパク質で構成されている。したがって、チミン・ストレスによる fra(X) (q27.3) の発現の決定要因は FS 領域の DNA 構造の遺伝的変異によると結論することができる。FS の発現に関与するタンパク質性諸要因はほとんどすべてマウス由来の遺伝子産物で置換しうることを意味している。

(3) Fra(X) (q27.3) 発現の細胞周期依存性と過剰チミジン効果

脆弱 X 染色体を含むチミジン要求性雑種細胞の利点は細胞を低濃度 BrdU 存在 (チミン・スト

レスと同義) 下で増殖させ、姉妹染色分体分染法を適用することにより、fra(X) (q27.3) 発現の細胞周期依存性を厳密に調べることができることである。低濃度 BrdU ( $2 \times 10^{-6} \text{M} - 2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 存在下で 2 ~ 3 細胞周期増殖させた細胞について、各細胞周期での FS 発現の頻度を調べたところ、ほとんどの発現は第 1 細胞周期、すなわちチミン飢餓条件下で 1 回 DNA 複製を行った細胞に観察された。この結果は、X 染色体上の FS 領域の DNA 複製が他の染色体領域に比較してチミン飢餓に高感受性であることを示唆している。次に fra(X) (q27.3) 発現に対するヌクレオチド不均衡の影響を検討するため、過剰チミジンの効果を脆弱 X 症候群由来のリンバ芽球細胞と前述のヒト・マウス体細胞雑種を用いて調べた。表 1 に示すように、各細胞系統で高濃度チミジン (1 ~ 3mM) 処理によって FS 発現が検出された。この過剰チミジンの FS 誘発効果はデオキシシチジン (CdR) 処理によって濃度依存的に阻害されることが示された。過剰チミジン処理による dTTP プールの上昇はリボヌクレオチド環元酵素をフィードバック阻害して細胞のヌクレオチド含量の不均衡を誘導し、特に dCTP プールを低下させることが知られている (図 2)。デオキシシチジ

ンの阻害効果を考慮すると過剰チミジンによる FS 誘発効果は低 dCTP が原因と考えられる。

#### (4) ディスタマイシンA誘導性FSの発現機構

白血病、固形腫瘍および関連疾病の患者群において、これまでに検出された遺伝性 FS は fra(8)(q24.1), fra(11)(p15.1), fra(16)(p12.1), fra(16)(q22), fra(17)(p12) の5種類で、いずれもディスタマイシンA誘導性の FS であった。そこで、癌多発家系の PV 患者に検出された fra(17)(p12) に着目して、その発現様式をヒト・マウス細胞雑種で調べた。この PV 患者は fra(17)(p12) のホモ接合体であった。患者由来の末梢血 T 細胞 (IL-2 短期培養) とマウス L 細胞 (TK<sup>-</sup>, APRT<sup>-</sup>) および FM3A 細胞 (TK<sup>-</sup>, APRT<sup>-</sup>) との体細胞雑種を作成し、HAT 選択培地でヒト17番染色体を保持させた。その初期培養において、FS 発現を調べたところディスタマイシンA処理によって fra(17)(p12) の特異的な発現が検出された。この FS の場合も fra(X)(q27.3) と同様、その発現が FS 領域の DNA 構造変異に起因している可能性が高い。

これらのヒト・マウス体細胞雑種をディスタマイシンAあるいは Hoechst33258 などの高 A-T 塩基配列に結合する物質で処理するとマウス染色体のすべての端部動原体領域にクロマチンの異常伸張が観察された。この現象は動原体を構成している高 AT サテライト DNA に起因していると考えられるが、FS 発現に類似した同位染色体切断は観察されなかった。したがって、同一条件下で発現されるヒト染色体上の fra(17)(p12) 領域は単純な高 AT 繰り返し配列とは異質であると考えられる。FS 変異はおそらくディスタマイシンAなどが特異的に結合すると考えられているモデル配列 (CGCGAAATTTCGCG) に類似した構造の突然変異と考えられる。

## 4. 討 論

### a. 日本人集団における遺伝性 FS の検索

3 群の同一検出系を用いて多数の一般健常人と癌患者について遺伝性 FS の頻度を直接比較検討した例は本研究が最初である。本研究において3 群9 種類の常染色体遺伝性 FS が検出されたが、そのうち6 種類はすでに諸外国 (すべてがコーカソイド) から報告されている FS と同一部位であった。カーカソイドで報告されている FS の種類とその頻度を本研究の結果と比較検討すると次のように民族間に差異が認められた。

(1) 葉酸感受性 FS: オーストラリアの新生児集団における頻度は0.14% (5/3458) であり、日本人 (0.49%, 5/1022) と比較すると統計的有意差はない ( $X^2=2.7, d.f.=1$ )。fra(2)(q11) および fra(11)(q13) は両民族に共通して検出されているが、オーストラリアの新生児集団および精神遅滞等の患者群で共通して検出される fra(10)(q23) は本調査では検出されなかった。

(2) ディスタマイシンA誘導性 FS: 日本では fra(16)(q22) と fra(17)(p12) とが比較的高頻度に観察された (それぞれ1.42%, 3.08%)。オーストラリアの患者群における fra(16)(q22) は 1.63% (8/491) で日本の頻度によく似ている。一方、ドイツの健常人集団を対象とした berenil により誘発される fra(16)(q22) の頻度は5.10% (18/350) で日本より有意に高い ( $X^2=12.2, d.f.=1, P<0.01$ )。

(3) BrdU 要求性 FS: イタリアの患者群における fra(10)(q25) の頻度は0.55% (8/1444) であり、日本人集団 (0.29%) と近似している。しかし、オーストラリアの新生児集団での頻度 (2.34%, 24/1026) は有意に高い ( $X^2=14.8, d.f.=1, P<0.01$ )。また、本研究において検出された次の3 種類のディスタマイシンA誘導性の FS, fra(8)(q24.1), fra(11)(p15.1), fra(16)(p12.1)、は類似の検出系を用いたオーストラリ

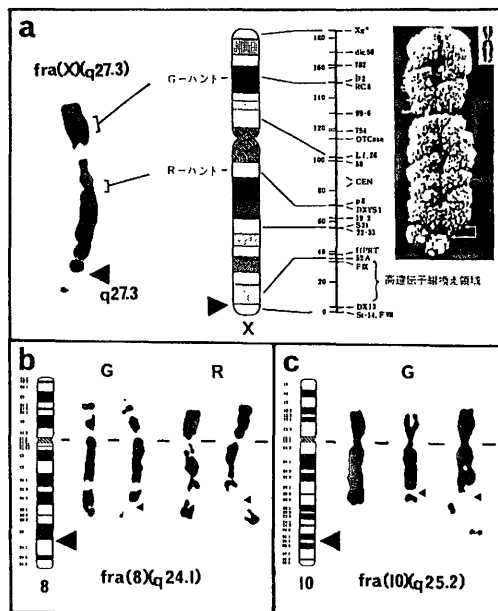


図4 葉酸感受性 fra(X)(q27.3)(a), ディスタマイシンA誘導性 fra(8)(q24.1)(b) および BrdU 要求性 fra(10)(q25.2) の発現部位

ア (491人) とドイツ (350人) での集団調査で検出されていないことから、これらは日本人集団に固有の変異である可能性が高い。

癌患者群の調査により、FS 保因者の全体的頻度は一般健康常人群と有意な差は認められなかったが、患者別の考察および腫瘍細胞の染色体再配列の解析結果から遺伝性 FS が腫瘍発生に直線的あるいは間接的に関与している可能性が示唆された。(1) AMMoL 症例における逆位切断点と fra(16)(q22) の一致ならびに、ANLL 症例における転座切断点と fra(11)(p15) との一致の事例は FS が直接的にがん化に関連している可能性を強く示唆している。(2) L 群の MDS や PV、C 群の婦人科良性疾病や肺癌などの特殊な疾患群において FS 保因者が高頻度が検出された。この場合 FS の種類と疾患の種類との間に 1 対 1 の対応が認められないので、FS そのものが発病の原因ではなく、保因の状態が発癌に有利に働いていることが想定される。(3) 癌患者群に検出されたディスタマイシン A 誘導性 FS は発癌関連遺伝子あるいはヒト・ウィルスとの関連においても興味ある染色体領域である。fra(8)(q24.1) 領域には c-myc, c-myc amplicon, バーキット・リンパ腫の染色体切断点、HPV-18 挿入あるいは HTLV-1 の挿入・欠失部位などが、fra(17)(p12) 領域には c-myc と同義の機能をもつ TP53 遺伝子が、fra(16)(q22) 領域には MT 遺伝子群が、そして、fra(11)(p15.1) 領域には c-Ha-ras、あるいは HSV 挿入・欠失部位などが位置しており、FS との相互関係を分子レベルで検討することも今後の重要な課題と思われる。

#### b. 遺伝性 FS の発現機構の解析

脆弱 X 症候群に密接に関連しているヒト X 染色体上の葉酸感受性 FS, fra(X)(q27.3) の発現機構をヒト・マウス体細胞雑種の実験系で解析した結果、FS の DNA 構造の遺伝的変異そのものが FS 発現の決定要因であり、マウス・ゲノムの存在あるいはヒト常染色体上の遺伝子産物は FS 発現に影響を与えないことが明らかとなった。また、この染色体領域の DNA 複製が低 dTTP と低 dCTP に高感受性であることが示された。したがって、脆弱 X 染色体の FS 領域は低 dTTP と低 dCTP にともに高感受性の、多分、高プリン/高ピリミジン塩基配列が関与した構造変異であろうと推測される。

最近、DNA 多型を応用したいわゆる RFLPs 解析により正常 X 染色体の Xq27-28 境界領域

は図 4 に示すように、recombination hot-spot であることが示された。また、脆弱 X 症候群家系には近接マーカーとまったく遺伝子組換えをおこさない家系と、より高頻度で組換え体を生じる家系とが存在すること、そして、その異質性が FS 発現頻度と臨床症状とに関連していることが報告されている。本症の高突然変異率と遺伝的異質性を考慮すると、脆弱 X 突然変異は高遺伝子組換え領域に生じた重複、逆位あるいは欠失などの染色体レベルのマクロな変異に起因している可能性が考えられる。

## 5. 結 論

日本人集団 (一般健康常人および癌患者) における遺伝性 FS の種類とその頻度を推定することができた。全体的な FS 保因者の頻度は約 5% で、20 人に 1 人の割合で遺伝的差異が生じてことになる。この染色体変異は無害の中立的多型ではなく、ある種の FS が疾病に直接的・間接的に関与している遺伝的素因である可能性が示唆された。また、FS の発現機構の解析から、遺伝性 FS は正常染色体上の特定の高遺伝子組換え領域に生じたマクロな染色体レベルの突然変異であることが示唆された。

既知の FS および本調査で検出された FS のほとんどは G バンド (ギムザ濃染部、後期複製型、分化関連遺伝子群) と R バンド (ギムザ淡染部、前期複製型、増殖必須遺伝子群) との境界部に位置している (図 4)。この境界部は DNA 複製のタイミングとともに遺伝子発現の調節にも関連している重要な構造領域と考えられる。また、この領域は遺伝子組換え、姉妹染色分体交換 (SCE)、あるいは外来性ウィルスや内在性トランスポゾン様配列の挿入・欠失などの変異性に富んだ領域で、生殖細胞あるいは体細胞での変異による直接的・間接的効果が遺伝的荷重に寄与している可能性も考えられる。その変異の 1 つが遺伝性 FS への突然変異であると考えられる。このような観点から FS 領域の DNA 構造を解析することは、内的・外的ストレスに応答するヒトのゲノム構造の解明と遺伝性疾患や癌などの疾病に関連する遺伝的変異性の理解に重要な手がかりを与えるものと思われる。

#### 〔研究発表〕

- 1) Hori, T., Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H, and Seno, T. : Chromosome

- breakage induced by thymidylate stress in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *Cancer Res.*, **44**, 703–709, 1984.
- 2) Hori, T., Ayusawa, D. and Seno, T. : Thymidylate stress and sister chromatid exchanges. In *Sister Chromatid Exchanges* (Tice, R.E. and Hollaender, A. eds), Plenum Publ. Co., New York, pp 149–159, 1984.
  - 3) Hori, T., Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H. and Seno, T. : Assignment of human gene encoding thymidylate synthase to chromosome 18 using interspecific cell hybrids between thymidylate synthase-negative mouse mutant cells and human diploid fibroblasts. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **11**, 277–283, 1985.
  - 4) Hori, T., Ayusawa, D., Glover, T.W. and Seno, T. : Expression of fragile site on the human X chromosome in somatic cell hybrids between human fragile X cells and thymidylate synthase-negative mouse mutant cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 977–983, 1985.
  - 5) Takahashi, E., Hori, T. and Murata, M. : A BrdU-requiring fragile site, fra(10)(q25), in a Japanese population. *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, 165–168, 1985.
  - 6) Takahashi, E., Hori, T. and Murata, M. : Distamycin A-induced fragility on chromosome 16, fra(16)(q22), in a Japanese population. *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, 299–302, 1985.
  - 7) Hanaoka, F., Tandai, M., Miyazawa, H., Hori, T. and Yamada, M. : Assignment of human gene for DNA polymerase  $\alpha$  to the X chromosome. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 441–444, 1985.
  - 8) Hanaoka, F., Tandai, M., Miyazawa, H., Murakami, Y., Hori, T. and Yamada, M. : Human DNA polymerase  $\alpha$ , Compensation for heat-labile mouse DNA polymerase  $\alpha$  and its localization on the X chromosome. *Mol. Biol. Med.*, **2**, 323–335, 1985.
  - 9) Murata, M., Takahashi, E., Ishihara, T., Minamihisamatsu, M., Takagi, T., Kaneko, Y. and Hori, T. : Heritable fragile sites and cancer : fra(16)(q22) in lymphocytes of an acute nonlymphocytic leukemia patient with inv (16)(p13q22). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **25**, 81–86, 1987.
  - 10) Murata, M., Takahashi, E., Minamihisamatsu, M., Ishihara, T., Wong, P., Bessho, M., Hirashima, K. and Hori, T. : Heritable fragile sites in patients with leukemia and other hematological disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**, 95–103, 1988.
  - 11) Takahashi, E., Hori, T., Murata, M. : Population cytogenetics of rare fragile sites in Japan. *Human Genet.*, **78**, 121–126, 1988.
  - 12) Takahashi, E., Hori, T. and Murata, M. : A new rare heritable fragile site at 8q24.1 found in a Japanese population. *Clin. Genet.*, **33**, 91–94, 1988.
  - 13) Hori, T., Takahashi, E., Tsuji, H., Tsuji, S. and Murata, M. : Fragile X expression in thymidine-protrophic and auxotrophic human-mouse somatic cell hybrids under low and high thymidylate stress conditions. *Cytogenet. Cell Genet.*, **47**, 177–180, 1988.
  - 14) Hori, T., Takahashi, E., Ishihara, T., Minamihisamatsu, M., Kaneko, Y. and Murata, M. : Distamycin A-inducible fragile sites and cancer proneness. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **34**, 177–187, 1988.
  - 15) Hori, T., Takahashi, E. and Murata, M. : Nature of distamycin A-inducible fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **34**, 189–194, 1988.

## 8. 正常細胞ならびに変異細胞の増殖分化統御因子の研究

色 田 幹 雄, 常 岡 和 子, 石 原 弘 (薬学研究部)

### Protein Factors Regulating Proliferation and Differentiation of Normal and Neoplastic Cells

Mikio Shikita, Kazuko Tsuneoka and Hiroshi Ishihara  
Division of Pharmaceutical Science

Human macrophage growth factor (M-CSF) and mouse granulocyte-macrophage growth factor (GM-CSF) were purified to homogeneity, and the amino acid composition and the N-terminal amino acid sequence of these protein factors were determined.

With the use of these purified preparations, enhancing effect of the hematopoietic factors on the proliferation and functions of normal mouse myeloid cells and radiation-induced mouse leukemic cells were demonstrated.

#### 1. 緒 言

正常な哺乳類細胞の増殖を統御する物質は、細胞成長因子という名前で総称される。特定の細胞種にのみ選択的に増殖を起させるものと、種々の細胞種に共通した作用を示すものがあるが、物質的にはポリペプチドないしは糖たんぱく質であって、標的細胞の細胞膜上に存在する特異的受容体との結合によって作用するという作用様式から考えても、細胞成長因子はたんぱく質ホルモンの仲間であるといえる。

細胞分化は増殖と共役して生ずる例が多い。増殖をくり返す間に次第に分化が進行し、増殖の停止後に分化が完成する。

最近、種々の細胞成長因子ならびに細胞成長因子受容体の一次構造が遺伝子工学的手法によって推定されて、いづれもがん遺伝子（オンコジン）産物と構造上の共通性があることが指摘されている。がん細胞は細胞成長因子依存性が異常になっていると思われる。

われわれは白血病細胞の発生と増殖統御の機構

In addition, mouse fibrosarcoma cells were cloned and a line of cells secreting both M-CSF and neutrophil growth factor (G-CSF) were obtained. A number of subclones were isolated which displayed heterogeneity with regard to their ability of secreting the above-mentioned two types of CSFs, while equilibration of the cells was developed so that all subclones became similar after cultivation for some time.

を解明することを目的として、ミエロイド系の未分化細胞の増殖分化を統御する細胞成長因子、とくに幼若マクロファージ増殖因子（M-CSF）、幼若好中球増殖因子（G-CSF）ならびにマクロファージにも好中球にも分化し得る二分化能をもつ白血球前駆細胞（CFU-GM）の増殖因子（GM-CSF）の研究を行った。

#### 2. 研究方法

##### a. 各種 CSF 精製の原料

1) ヒト尿；ヒト尿中のたんぱく質をトクシール UR に吸着させて沈殿させ、1%アンモニアで抽出した後、80%硫酸沈殿を集め、ヒト M-CSF の粗原料とした。

2) ヒト腹水；腎不全患者の携行腹膜透析液（CAPD）を限外濾過法により濃縮し、80%硫酸沈殿を採り、上と同じくヒト M-CSF の粗原料とした。

3) 動物細胞培養液；マウス線維肉腫細胞（NFSa 株）を合成培地または10%血清存在下で培養した培養上清を限外濾過で濃縮し、ラットマ

たはマウス G-CSF の原料とした。また、ラット脾形質細胞 (RSP-2-P3) を無血清培地中で培養して得られた培養液上清をマウス GM-CSF の原料とし、同じくマウス線維芽細胞 (L-P3) を無血清培養してマウス M-CSF 精製の原料とした。

#### b. 各種 CSF の精製と構造解析

各 CSF 粗原料は、はじめ DEAE セルロースなどを用いたイオン交換クロマトグラフィ、セファデックス G-100 などを用いたゲル濾過クロマトグラフィ、フェニルセファロースなどを用いた疎水クロマトグラフィなど常圧低速の古典的精製法によって、できるかぎり比活性を高めた後、高速液体クロマトグラフ (HPLC、または FPLC) によって最終純度にまで精製した。最終標本を、SDS 存在下でのポリアクリルアミド電気泳動で純度を確認し、気相エドマン分解法によりアミノ末端アミノ酸残基配列を決定した。

#### c. ミエロイド系未分化細胞の培養

1) マウス骨髓細胞; C3H/He マウスの大腿骨より採取した骨髓細胞を 0.3% 寒天または 0.8% メチルセルロース含有培地中に分散培養し、1 週間後に生じた細胞集落数を培養顕微鏡下で計数して、増殖因子の力価の指標とした。

細胞集落 (コニロー) よりエッペンドルフピペットを用い細胞を釣り上げた後、サイトセントリフュージによりプレパラートをつくり、ヘマトキシリン・エオジン染色した後に顕微鏡下で観察して細胞種を同定した。また、コロニー全体としてエステラーゼ染色し、コロニーの分類を行った。

2) ヒト骨髓細胞; 骨髓穿刺により得られた細胞から付着性の細胞を除いた後さらにカルボニル鉄法により食細胞を除いてから、上記マウス骨髓細胞の場合とほぼ同様の方法により培養し、2 週間後に観察した。

#### d. 各種 CSF の生体内作用

6 日間の連続投与の方法としては、浸透圧ミNOPP (アルザ 2001) を用いた。マウス腹腔内に埋め、はじめに装填した量からポンプ内に残存した量を差し引いた量を投与量とした。別に行った実験では、腹腔内にくり返し注射をした。

#### e. 成熟マクロファージの活性化

マウス腹腔内の常在マクロファージを集め、一定期間 CSF 存在下で培養した後、ルミノールを培地に加え、3 分後にザイモサン刺激をしたときにマクロファージが産生するスーパーオキシドによりルミノールが酸化されて生ずる蛍光をルミネ

センスアナライザー (ベルソルド LB9505) で経時的に記録した。

#### f. X線照射実験

1) マウスの全身照射; X線照射装置 (島津・信愛 250 II 号) を用いた。20mA, 200kVp で発生する X 線を、0.5 mm Cu/1.0 mm Al のフィルターを通し、線量率として 0.9~1.0Gy/min の条件で、マウス脊面より照射した。

2) 培養細胞の照射; プラスチックペトリ皿中に上記のごとく培養したマウス骨髓細胞を照射するときも、上とほぼ同じ条件下で信愛 250 II より発生する X 線を用いた。

いずれの場合も、X 線の線量はイオン化ゲージ (ラドコン) を用いて計測した。

#### g. 放射線誘発マウス白血病細胞の培養

白血病細胞  $10^6$  をマウスに静脈注射し、2~3 週間後、肥大脾臓より白血病細胞を回収することで白血病細胞を多量に得た。この細胞を直径 6 cm のシャーレに  $10^7$  ずつ入れ、10% ウマ血清を含む McCoy5A 培地 5ml で培養した。M-CSF を添加して培養をする際には部分精製ヒト尿 CSF を皿あたり 500 単位加えた。

#### h. マウス白血病細胞の c-fms 発現

培養白血病細胞および調製白血病細胞から、グアジニ熱フェノール法により粗 RNA の抽出を行なった。粗 RNA を LiCl 沈殿し、Li を除去した後、グリオキシニン化して 1% アガロースゲル電気泳動 (10mM 磷酸ナトリウム緩衝液 pH6.8) で分離した。ゲル内の RNA をナイロン膜 (ポール社 BNRG) に Northern ブロット法で転写し、焼き付けを行なった。このナイロン膜を常法に従い  $^{32}\text{P}$  標識化 DNA プローブと処理することでハイブリダイゼーションを行なった。プローブはネコ腫瘍ウイルス由来の腫瘍遺伝子 v-fms (JCRRB より供与) の一部断片を使用した。v-fms 産物の細胞内ドメインに相当する領域の cDNA を pUC 19 プラスミドに組込み、大量調製した後、ニクトランスレーション法により d- $^{32}\text{P}$ -dCTP で内部標識した。

### 3. 結果

#### a. ミエロイド未分化細胞増殖因子の精製

1) 正常ヒト尿中のマクロファージ増殖因子;

幼若マクロファージの増殖と成熟を特異的に促進する物質が正常なヒトの尿中に存在することは 20 年も前から知られていたが、微量であるために

表1 正常ヒト尿よりマクロファージ増殖因子 (M-CSF) の精製

Step	Protein (mg)	M-CSF		Recovery (%)
		Units ( $\times 10^{-6}$ )	Units/mg ( $\times 10^{-3}$ )	
1. Tokusil/ammonium sulfate	46300	833	18	100
2. DEAE-Cellulofine AH	21100	950	45	114
3. DE52	6110	489	80	59
4. Phenyl-Sepharose CL-4B	240	264	1100	32
5. Sephacryl S300	7.5	188	25000	23
6. Superose-12 FPLC <sup>a</sup>	3.0	135	45000	16
7. $\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> FPLC <sup>a</sup>	0.20	21	105000	2.5

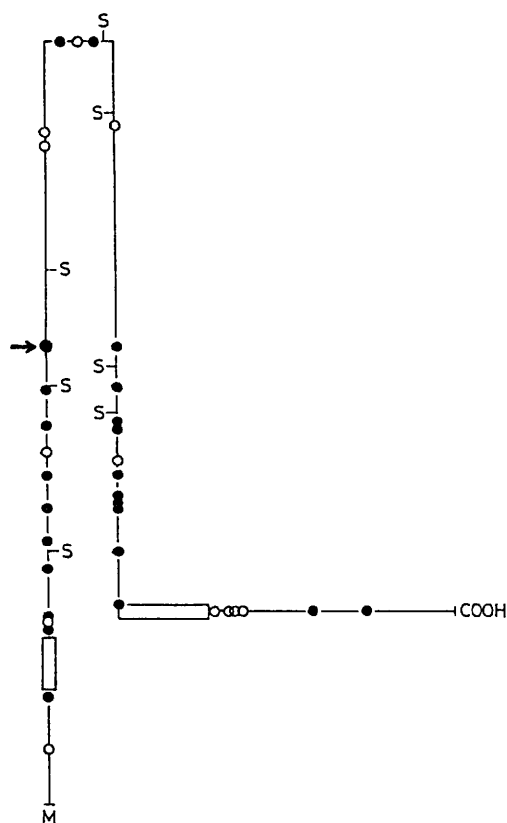


図1 ヒト M-CSF の一次構造にみられる対称性

黒丸はセリン残基, 白丸はアルギニン残基, Sはシステイン残基, Mはメチオニン残基, 長方形は疎水性アミノ酸残基が密集している領域を示す。矢印は37位のセリン (本文参照)

精製ができなかった。我々はヒト尿よりウロキナーゼを精製する過程の残渣に、この物質が大量に含まれていることを1979年に報告した。この度、表1に示したような手順で、ようやく純化することができた (Sakai et al., 1987)

我々が精製したたんぱく質のN末端から44位までのアミノ酸残基配列は、Kawasaki ら (1985) がヒト癌細胞株を用いて遺伝子工学的手法で推定した M-CSF のN末端配列と、1ヶ所の相違以外は一致した。我々が精製したマクロファージ増殖因子は、37位のアミノ酸残基がフェニルアラニンではなくセリンであった。この相違は、セリンのコードンである TCT または TCC が、1塩基置換されて TTT または TTC になったことで説明できるが、この相違が人種の差によるものか、癌と正常との差か、分析誤差か、理由はわからない。

Kawasaki らが推定したヒト M-CSF の一次構造上で、セリン残基が存在する位置を注目すると、図1に示したように、M-CSF には86位のアルギニン残基を中心とする対称性が存在することを指摘できる。上記の37位のセリン残基は136位のセリン残基と対称的位置にあるべき存在であり、我々が精製した M-CSF の37位のアミノ酸残基がフェニルアラニンではなくセリンであったことは、単なる分析誤差ではないと思われる。我々は、偶然セリン残基に注目せざるを得なかったので、図1に示したような対称性に気付いたのであるが、Kawasaki らは M-CSF の分子内対称性については論及していない。

ところが、我々が精製した M-CSF のアミノ酸組成をしらべた結果、Kawasaki らの推定し

37 149 150 447 448 522  
Glu—Phe—Gln Asp—Thr Gly—Val  
149 aa 298 aa

<sup>37</sup> Glu—Phe ————— Gln Gly ————— <sup>224</sup> Val  
 149 aa 75 aa

37 190  
Glu-Ser-----??

TPA 30-1 Cell M-CSF=Wong らが推定した構造；  
MIA-Pa Ca Cell M-CSF=Kawasaki らが推定した構造；  
Human Urine M-CSF= 本研究で推定した構造。

勝田・高岡から分与を受けた無血清順応生育細胞株のうち、RSP-2・P3 と呼ばれる細胞が、GM-CSF を分泌する細胞であることを、我々は1980年に報告した。

著しい白血球増多症を併うマウス線維肉腫 (NFSa) の肉腫組織中に、M-CSF ならびに

G-CSF が含有されていることを発見した (Sakai et al., 1984)。この肉腫細胞は10%仔牛血清存在下でペトリ皿中に平面培養した状態でも上記2種類のCSFを分泌し続けることがわかった。また、この肉腫を移植したマウスの尿中にも2種類のCSFが排泄され、G-CSFはマウスのみならずヒトの好中球の増殖促進効果も有することが示された (Bessho, et al., 1984)。

M-CSF 分泌する培養細胞は他にも種々知られているが、M-CSF 以外に G-CSF をも分泌する例は稀である。上記の線維肉腫には M-CSF 産生細胞と G-CSF 産生細胞が混在しているとの仮説に立って、両者をそれぞれクローン化することを試みた。0.3%寒天培地中に単細胞分散培養して15種類のクローンを得た。そのうち3つのクローンは、主として M-CSF を分泌したが、他の12クローンは2種類のCSFを同時に分泌した。はじめの3クローンから上と同じ方法でサブクローンを作ったが、いずれのサブクローンも種々の比率で2種類のCSFを産生した。専ら M-CSF を産生するという性質は不安定であり、2種類のCSFを同時に分泌するが比率は

一定ではないと結論した (Sakai et al., 1987)。

この線維肉腫細胞は東大・医科研の長田重一博士による、マウス G-CSF の cDNA クローニングならびに G-CSF ゲノム解析に使用され、大変に役立った。長田らの研究により、ヒトとマウスの G-CSF の一次構造には、他の CSF にみられる程の著しい動物種差がないという推定がなされ、ヒト好中球の増殖にも有効であるという我々の観察が正しいことが裏付けられた。

### c. 各種 CSF の生物活性

1) 培養したミエロイド未分化細胞に対する作用；

上記ヒト尿からの M-CSF ならびに RSP-2・P3 培養液からの GM-CSF を単独または組合せて用い、0.3%寒天または0.8%メチルセルロース含有培地中にマウス骨髓細胞を分散培養した。増大しつつある細胞集落をキャピラリで拾い上げて、異なるCSFを含む培地に移植し直したり、短いキャピラリを寒天に突き差して他の集落の細胞が入り込むのを防止した条件下で、集落構成細胞種を電顕観察し、M-CSF もしくは GM-CSF のいずれか単独にのみ反応して増殖

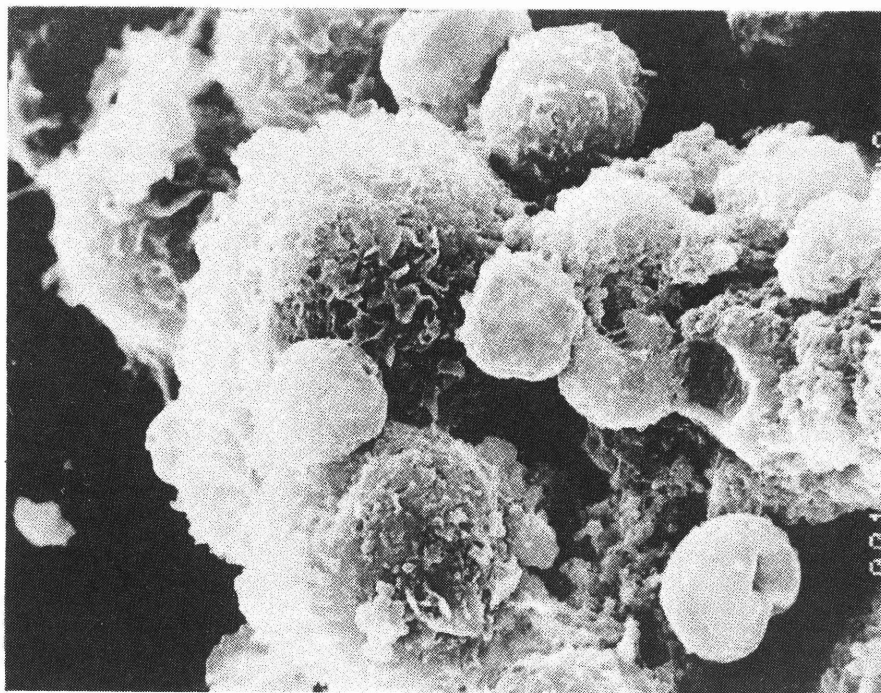


図3 GM-CSF によりつくられたマクロファージ  
好中球混合集落の走査電顕 (×12000) 培養開始7日目。

する細胞と、いずれにも反応しうる細胞の3種類の未分化細胞の動態を明らかにした (Wu et al., 1987)。図3に電顕写真の1例を示す。

寒天培地中に培養したマウスマクロファージ幼若細胞が、M-CSFによる増殖刺激を受けてから、実際に増殖を開始して2つの細胞に分裂するまで、およそ40時間の遅れが存在する。この間のいろいろな時点で1~3GyのX線照射を行い、増殖刺激を受けた幼若細胞の放射線感受性の経時的变化を追跡した。培養した癌細胞の中には細胞種によって、細胞周期に依存して放射線感受性が著しく変化する例が知られているが、図4に示したごとく、正常マクロファージ幼若細胞に関しては増殖刺激後の放射線感受性の変化を証明することはできなかった。(Sugavara et al., 1987)

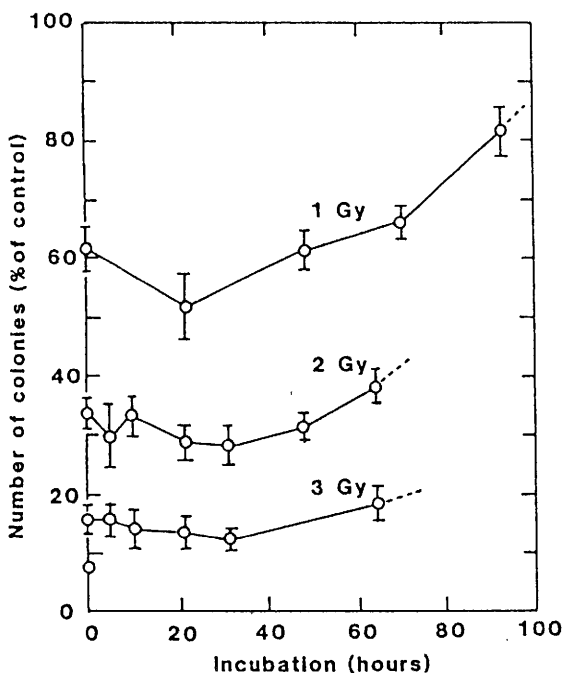


図4 M-CSFによる増殖刺激を受けた後の幼若マクロファージの放射線感受性

## 2) 腹腔内常在成熟マクロファージの活性化;

マウス腹腔内に常在するマクロファージを集め、血清を含みぬ基礎培地中で1~3日間培養した後、ザイモサン刺激に反応してスーパーオキシドを産生する能力を、ケミルミネッセンス法でし

らべた。上記のごとく細胞増殖が生じない環境下で、M-CSFはマクロファージ機能を亢進させ、スーパーオキシド産生が倍増することが示された。M-CSFは幼若マクロファージの増殖信号としての役割の他に、成熟マクロファージの活性化信号としての役割ももっていると思われる (Kana-da et al., 1987)。しかし、M-CSFを過剰に投与すると一般のたんぱく質ホルモンの場合と同様に“down regulation”と呼ばれている現象が生じ、マクロファージは逆に不活性化されることも示された。

## 3) 生体内における幼若白血球増加作用;

正常ヒト尿より精製したM-CSFは、ペトリ皿中に培養したマウス幼若マクロファージの増殖を促進する作用をもっているが、このM-CSF総量8~10KUを6日間にわたってマウスの腹腔内にミニポンプを用い連続投与したとき、大腿骨髄中の幼若マクロファージ数が対象の約2倍に増加することが示された (Sakai et al., 1987)。同様の増加は、正常マウスまたはX線 (3 Gy) 全身被爆マウスに、総量224~750KUのM-CSFを10~14回に分けて腹腔内注射したときにも認められた。断続的投与法は連続投与に比べて非能率であると思われる。

d) c-fms遺伝子の発現; マウス白血病細胞におけるc-fmsmRNAの検出を行った (表2)。

表2 マウス白血病細胞におけるc-fmsRNA

細胞	RNA サイズ (キロ塩基)
ヒトHL60	約4.5
マウスマクロファージ	約4.3
白血病8720	約4.3, 2.5
" 8072	約4.3, 2.5
" 8010	約4.3
" 8705	約4.3
" 8718	約4.3
" 8726	約4.3
" 8738	約4.3

各細胞から、ヒト白血病細胞HL60のc-fmsRNAよりやや分子量の小さいRNAを検出した。このマウスc-fmsRNAがヒトのそれに比して分子サイズが低いことは既報のc-fmscDNA構造と矛盾しない。しかし、吉田らの実験結果から、これらの各白血病細胞のM-CSF応答性は異なっているにも関わらず、c-fms発現量に相違は検出できなかった。この

ことは、少くとも表2に示すマウス白血病細胞株において、M-CSF 応答性とその受容体遺伝子である *c-fms* の発現に直接の相関のないことが示された。

M-CSF 応答性の白血病細胞である8720株をM-CSF と共に一次培養を行ない RNA を調製し、*c-fms* 発現を Northern プロットハイブリダイゼーションにより調べた。表2に示した様に、8720株は4.3キロ塩基および2.5キロ塩基に *c-fms* RNA を産生した。M-CSF 無添加で24時間培養を行なった後の細胞において *c-fms* RNA の産生パターンに変化は認められなかったが、M-CSF 存在下の一次培養細胞で更に1-1.2キロ塩基の RNA が検出された。

この低分子 *c-fms* mRNA 種生成の要因として、正常 *c-fms* 転写物の分解もしくは低分子の異常 *c-fms* RNA の生合成という、二通りの現象が考えられる。前者であるならば、本来ランダムに切断を受ける mRNA 分解機構とは異なる新しい未知の分解機構により、*c-fms* mRNA 分解が調節を受け、この機構が M-CSF 応答系支配であることを示唆している。また、後者であれば、M-CSF により誘発とれる未知の *c-fms* 発現機構の存在を示唆している。この低分子 *c-fms* mRNA の解析は、M-CSF に対する応答機構研究の緒となると考えている。

#### 4. 討 論

本研究においては、ヒト・マクロファージ増殖因子ならびにマウス・マクロファージ・好中球増殖因子の精製と、N末端アミノ酸残基配列を解明することができた。これらの因子はいずれも糖たんぱく質であり、且つ存在する量が極めて僅かであるために、従来の方法では精製が困難であった。疎水クロマトグラフカラム、セラミック吸着クロマトグラフカラムなどを使用して高速液体クロマトグラフィによって、最終的な精製により成功した。また、アミノ酸配列を決定するに際しても、気相状態で自動的にエドマン分解反応を行う分析機器を利用できたので、極く微量の精製標本により配列の決定ができた。

最近、遺伝子工学的分析法が格段の進歩をとげたので、mRNA を cDNA 化した後にクローニングを行い、得られた cDNA クローンのヌクレオチド配列を決定して、もとのたんぱく質の一次構造を推定することができるようになった。しかしながら、この方法によって求められる一次構

造は、あくまで推定構造であるにすぎない。mRNA 生成に際して生ずるスプライシングや、たんぱく質が生成した後に生ずるプロセッシングによって、最終生成たんぱく質の構造が必ずしも cDNA 解析から求められた推定構造と一致するとは限らない。

本研究では、最終生成物であるたんぱく質自身の一次構造ならびにアミノ酸組成を分析した。遺伝子工学的手法に比べて大変労力と時間を要する仕事であったが、2種の増殖因子の精製と部分構造の解明をすることができたのは幸であった。

精製した上記の増殖因子を用いて、放射線被ばくマウスの造血機能への刺激効果や、ベトリ皿中に培養したマウス骨髓細胞の放射線感受性に対する効果などをしらべた。この方針に沿った研究は、遺伝子工学的手法によって調製した増殖因子を用いて、ひき続き行っている。動物実験を行うには、大量の調製標本を必要とするので、遺伝子工学的手法を利用せざるを得ない。

本研究では、マクロファージ増殖因子受容体の解析にも遺伝子工学的手法を応用した。ネコ腫瘍ウィルス由来の腫瘍遺伝子 *v-fms* は、マクロファージ増殖因子受容体遺伝子と共通した構造をもっていることが知られているので、*v-fms* cDNA 断片をプローブとして、放射線誘発マウス白血病の各種の株について、マクロファージ増殖因子受容体遺伝子の発現量と、mRNA の分子サイズを検索した。その結果、7株中2株にサイズ変異を認めた。

マクロファージ増殖因子は、G-CSF や GM-CSF など他の CSF と異り、急性骨髓性白血病の治療薬として役立つ可能性が高いといわれている。上記の変異受容体の出現と白血病の病状との関係について今後とも研究を続ける予定である。

#### 5. 結 論

ヒト・マクロファージ増殖因子 (M-CSF) ならびにマウス・マクロファージ・好中球増殖因子 (GM-CSF) を純化し、アミノ酸組成ならびに N末端のアミノ酸残基配列を決定した。

これらの精製 M-CSF ならびに GM-CSF を用いて、*in vitro* ならびに *in vivo* において、正常のミエロイド系細胞や放射線誘発白血病細胞に対する増殖ないしは機能促進効果を証明した。

また、マウス線維肉腫細胞で M-CSF と好中球増殖因子 (G-CSF) を同時に分泌する細胞を

クローン化した。さらに数多くのサブクローンを分離し、上記2種類のCSF産生能に関するサブクローン間の多様性と平衡化現象を明らかにした。

# [研究発表]

- 1) Ishii, Y., Shinoda, M.\* and Shikita, M. : Specificity of the suppressive action of glucocorticoids on the proliferation of monocyte/macrophages in the CSF-stimulated cultures of mouse bone marrow. *Exp. Hematol.*, **11**, 178-186, 1983
- 2) Sakai, N.\*, Tsuneoka, K. and Shikita, M. : Occurrence of a monocyte/macrophage colony-stimulating factor in the continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids and its chromatographic behaviors and antigenicity compared with human urinary colony-stimulating factor. *J. Cell. Physiol.*, **118**, 1-5, 1984.
- 3) Sakai, N.\*, Shikita, M., Tsuneoka, K., Bessho, M. and Hirashima, K. : Macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor separated from fibrosarcoma tissue in mice. *Gann*, **75**, 355-361, 1984.
- 4) Tsuneoka, K. and Shikita, M. : A granulocyte colony-stimulating factor from serum-free cultures of RSP-2·P3 cells : Its separation from a macrophage colony-stimulating factor and its biological and molecular characterization. *Cell Struc. Func.*, **9**, 67-81, 1984.
- 5) Bessho, M., Shikita, M., Tsuneoka, K., Sakai, N. and Hirashima, K. : Stimulation of human and murine bone marrow cell colony formation by colony-stimulating factors obtained from the urine of mice bearing leukytosis-inducing fibrosarcoma. *Gann*, **75**, 993-1001, 1984.
- 6) Tsuneoka, K. and Shikita, M. : A colony-stimulating factor for neutrophil granulocytes ; A marked increase of its production by the addition of sodium butyrate and lipopolysaccharide in serum-free culture of RSP-2·P3 cells. *J. Cell. Physiol.*, **125**, 436-442, 1985.
- 7) Kanada, T., Shikita, M., Tsuneoka, K., Sakai, N.,\* Tomita, T.\*\* and Kanegasaki, S.\*\* : Effect of macrophage colony-stimulating factor on the function of resident peritoneal macrophages. *J. Pharmacobiodyn.*, **10**, 215-219, 1987.
- 8) Sugawara, S.\*, Tsuneoka, K., Ohara, H. and Shikita, M. : Radiosensitivity of mouse myeloid stem cells in culture after stimulation by macrophage colony-stimulating factor. *J. Radiat. Res.*, **28**, 126-134, 1987.
- 9) Sakai, N., Ishii, Y. and Shikita, M. : Increase in macrophage progenitor cell number in femoral marrow of mice after continuous infusion or repeated injections of a macrophage colony-stimulating factor. *J. Pharmacobiodyn.*, **10**, 404-407, 1987.
- 10) Wu, C.-t., Wang, Y.-z., Liu, F.-l., Tsuneoka, K. and Shikita, M. : Kinetics of the clonal proliferation of granulocytes and macrophages in cultures of mouse bone marrow cells as supported by two distinct types of colony-stimulating factors. *Cell Struc. Func.*, **12**, 327-337, 1987.
- 11) Sakai, N., Umeda, T., Suzuki, H., Ishimatsu Y. and Shikita, M. Macrophage colony-stimulating factor purified from normal human urine. Amino-terminal sequence and amino acid composition. *FEBS Lett.*, **222**, 341-344, 1987.
- 12) Sakai, N., Kubota, M., Shikita, M., Yokota, M. and Ando, K. : Intracolonial diversity of fibrosarcoma cells for the production of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *J. Cell. Physiol.*, **133**, 400-404, 1987.
- 13) Tsuneoka, K. and Shikita, K. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from RSP-2·P3 cells : Purification, N-terminal sequence and species-specificity of its action. (Manuscript in preparation).

## Ⅱ ヒトの遺伝的リスクの評価に関する 調査研究 概説

戸 張 巖 夫 (遺伝研究部)

### General Activities of Genetic Effects Research Group

Izuo Tobari  
Division of Genetics

In view of the importance to know genetic effects of ionizing radiation to man, a research project on genetic risk assessment of low level radiation to man has been initiated in 1983 as a program of the project research on the risk assessment of low level radiation.

The major objective of this research is to elucidate the dose-response relationships for induction of mutations and chromosome aberrations in cultured mammalian cells as well as in male germ cells of primates. For this purposes, following three programs were carried

out by scientists in Division of Genetics in collaboration with staffs of Division of Technical Sciences.

- 1) Studies on dose-response relationships for induction of chromosome aberrations in stem-spermatogonia of the crab-eating monkey after low and high dose-rate  $\gamma$ -irradiation.
- 2) Risk estimation of radiation mutagenesis in man by using cultured mammalian cells.
- 3) Effects of ionizing radiation on male germ cells of the crab-eating monkey.

放射線の遺伝障害は、身体的影響特に発がんとならんで、放射線の生物に対する影響の二大対象となるものである。したがって、放射線の遺伝障害の生成と修復に関する科学的データを得ることは、ヒトに対する放射線のリスク評価のための基盤となるものであり、放射線の安全管理の基礎となる線量基準の設定に科学的根拠を与えるために不可欠である。

ヒトに対する放射線のリスク評価の中心課題は、低レベル放射線による遺伝障害、突然変異や染色体異常の誘発頻度の線量との関係を正確に把握することによって、遺伝リスク係数を求めることである。このため昭和48年から昭和57年の10年間にわたって行ってきた特別研究「放射線による遺伝障害の危険度の推定に関する調査研究」においては、末梢リンパ球における染色体異常、培養細胞での突然変異など、適切な材料、方法を用いて線量限度（許容線量）0.05Gy 付近までの線量効果関係を求めるとともに、低線量効果の理論的

推定の基盤となる誘発機構の解析とパラメータを得るための研究を行い、同時にヒトに近縁な霊長類を実験動物として確立し、これらを用いてヒトとの相互関係に関する科学的知見を得るための研究を行った。その主たる成果は次の如くである。

①ヒト末梢血を用いて、低レベル・トリチウムによる染色体異常の線量効果が二相性を示すことを明らかにした。

②ヒトおよびカニクイザルの末梢血を用いて、0.05—3.00Gy の線量域における染色体異常の線量効果関係のデータを得、0.3Gy 以下では線量効果の非直線性を示唆する結果を得た。

③ヒトおよびカニクイザルの末梢血における放射線誘発染色体異常に対して明らかな線量率効果がみられたが、その効果には著しい種差があることが明らかになった。

④マウス培養細胞系を用いて、電離放射線による突然変異誘発の 0.25—3.00Gy までの線量効果関係のデータを得、この範囲で線量効果は直線関

係を示すことを明らかにした。

⑤マウス白血病細胞から DNA 損傷の修復欠損変異株を多数分離し、その遺伝学的、細胞遺伝学的特性を明らかにし、放射線による突然変異、染色体異常のリスク係数が修復と密接に関係していることを実証し、しきい値と修復の相互関係を示唆する重要な知見を得た。

⑥培養細胞における放射線誘発突然変異の頻度には、ヒト、マウス間で大差がないことを示唆する結果を得た。

⑦遺伝効果の新しい指標として、カニクイザル、ゴールデンハムスターの精子形態異常が有効であることを実証した。

以上の研究成果をふまえて、本特別研究では次の3つの課題について研究を行った。

①霊長類による放射線誘発染色体異常のリスク推定の研究

②培養細胞によるヒトの放射線突然変異のリスク推定の研究

③放射線による遺伝障害の検出システムの開発に関する研究

5年間の研究成果の要約は下記の通りである。

①霊長類による放射線誘発染色体異常のリスク推定の研究

放射線によって生ずる相称性の染色体異常、特に相互転座が生殖細胞に誘発されると、次代に先天性奇形児を出産する危険性がある。この研究ではヒトに近縁なカニクイザル雄の生殖細胞における相互転座の誘発頻度と線量との関係を求め、先天性奇形児出産のリスク推定の基礎的データを得ることを目的として行われた。 $\gamma$ 線局部急照射(0.25Gy/分)による相互転座の出現頻度に関する線量効果関係は、2Gyに最大頻度をもつ山型の線量効果曲線を示すが、1Gy以下の低線量域では直線性を示すことを明らかにした。この直線関係を示す線量域での相互転座誘発率は1Gy当たり1.79%と推定された。また、 $1.8 \times 10^{-5}$ Gy/分の低線量率で連続全身照射を受けた場合には、少なくとも1.5Gy以下の線量域では、線量効果は直線関係を示し、1Gy当たりの誘発率は0.16%と推定された。これらの結果から、低線量率 $\gamma$ 線照射による相互転座の誘発頻度は、高線量率照射に較べて約10分の1に減少することが明らかになった。また低線量率照射による相互転座の誘発率から、転座由来の先天性奇形児の出現頻度は、0.01Gy当たり  $0.72 \times 10^{-6}$  と推定された。

②培養細胞によるヒトの放射線突然変異のリスク推定の研究

ヒトの培養細胞を用いて突然変異検出系を確立し、この系を用いて放射線誘発突然変異の線量効果を明らかにするとともに、その結果をマウス培養細胞の結果と比較検討し、突然変異誘発の種差を知る。さらに突然変異生成を規定している修復機構について遺伝子レベルで調べ、突然変異のリスク係数に種差の生じる要因の解析を行う目的で研究を行った。

マウス白血病細胞(L5178Y)より種々の変異原感受性変異株の分離に成功した。その一つであるマイトマイシンC感受性変異株は2相補性群に分類され、おそらくDNA鎖間の架橋修復に欠損があると考えられる。X線感受性変異株も6株分離され、少くとも2相補性群に分離された。X線、紫外線、架橋剤、アルキル化剤、および4NQOのいずれに対しても感受性を示す多重変異原感受性変異株の分離に成功した。この株を使用し、増殖阻止面積を測定することによって、環境変異原を鋭敏かつ容易に検出できることを示した。さらに除去修復欠損である紫外線感受性株について、マウス細胞とチャイニーズハムスター細胞とを比較し、マウス紫外線感受性相補性群1はチャイニーズハムスター相補性群5と同じ機能をもっていること、さらにそれぞれの欠損を補正するヒト遺伝子ERCM2とERCC5がともにヒト第13染色体上に位置していることが明らかとなった。これらの感受性を支配している遺伝子のクローニングを行うため、部分細胞雑種形成法を考案し、形質転換効率の高い紫外線感受性除去修復欠損細胞の作製に成功した。

③放射線による遺伝障害の検出システムの開発に関する研究

放射線によるヒトの遺伝的リスクを評価するためには個人の遺伝損傷を明らかにし、これを集団レベルで把握する必要がある。このため、動物個体の生殖生理に及ぼす放射線の影響を検知する新しい検出システムの開発を目的として研究を行った。

まずカニクイザルの実験動物学的検討を行い、電気射精技術による精液採取法および条件を確立し、繁殖生理学的基礎データを集積した。カニクイザルの精子濃度、精巣容積におよぼす放射線の影響について検討を行い、照射後のカニクイザルの雄生殖細胞に対する放射線の致死効果は、ハムスター、マウスに較べて著しく大きいことが明らか

かとなった。さらにカニクイザル、マウスを用いて精子形態異常の型、放射線感受期、線量効果関係を調べ、初期精母細胞～後期精原細胞が最も高感受性あること、 $\gamma$ 線急照射では 2Gy までの線量

効果は直線関係を示すことを明らかにした。これらの結果から精子形態異常、特に頭部形態異常が放射線による遺伝損傷の有効な指標となることを明らかにした。

# 1. 霊長類による放射線誘発染色体異常の リスク推定の研究

戸 張 敵 夫, 松 田 洋 一, 宇津木 豊 子, 中 井 斌  
(遺伝研究部)

## Studies on Dose-Response Relationships for Induction of Chromosome Aberrations in Stem-spermatogonia of the Crab-eating Monkey after Low and High Dose-rate $\gamma$ -irradiation

Izuo Tobari, Yoichi Matsuda, Toyoko Utsugi and Sayaka Nakai  
Division of Genetics

In order to estimate the genetic risks of ionizing radiation to man, it is of importance to study the quantification of radiation-induced translocations in stem-spermatogonia of mammalian species. In order to extrapolate from the animal data to man, it is necessary to obtain data from germ cells of a number of mammalian species and to evaluate variations among species. The data on the dose-response relationship for yield of translocations obtained in higher primates closely related to man are especially valid for a quantitative extrapolation to man. The humped-shape dose-response curve has already reported in the rhesus monkey, marmoset and man, though the dose showing a peak frequency of translocations varies among these species. Furthermore, the most noticeable finding has been that the frequencies observed in the rhesus monkey were significantly lower than those in other species.

To extend information in higher primate, we selected the crab-eating monkey, *Macaca fascicularis* which belongs to the same genus as the rhesus monkey, as experimental animal in this study, because the crab-eating monkey

breeds well in captivity all the year round, and we observed the radiation-induced reciprocal translocations in stem-spermatogonia.

The frequencies of translocations induced by acute  $\gamma$ -irradiation at 0.25 Gy dose rate were 0.09% at 0 Gy, 0.53% at 0.25 Gy, 1.07% at 0.50 Gy, 1.86% at 1.00 Gy, 2.47% at 2.00 Gy and 1.33% at 3.00 Gy. Consequently, over the low dose range below 0 to 1 Gy, dose-response relationship for translocation induction was linear one. The dose-response curve was well fitted with the linear equation indicated by  $Y = 1.08 \times 10^{-3} + 1.79 \times 10^{-2}D$ . However, over the dose range 0-3 Gy, the dose-response curve was humped with a peak yield around 2 Gy. No remarkable inter-animal variations in the translocation induction were observed. The induction rate per Gy of translocation in the crab-eating monkey was significantly higher than that in the rhesus monkey.

The frequencies of translocations induced by chronic  $\gamma$ -irradiation ( $1.8 \times 10^{-5}$  Gy/min, about 0.024 Gy/22 h/day) were 0.15% at 0.3 Gy, 0.27% at 1.0 Gy and 0.33% Gy at 1.5 Gy.

The dose-response relationship for translocation yield was linear one with a regression coefficient of  $0.16 \times 10^{-2}$ , and can be described as  $Y = 0.94 \times 10^{-3} + 0.16 \times 10^{-2} D$ .

When comparing the frequency/Gy of translocations after very low dose rate  $\gamma$ -irradiation (0.16/100 cells) with that after high dose rate  $\gamma$ -irradiation (1.79/100 cells), it is clear

## 1. 緒 言

放射線によって生殖細胞に生ずる大部分の染色体異常、特に構造異常は致死効果を示し、生殖細胞の形成過程において淘汰されるならば、次代に有害な遺伝的影響を残すことはないと考えられる。しかし致死効果を示さない相称性異常、特に相互転座型の異常が生殖細胞に誘発されると、接合子の早期死亡や奇形発生の原因となることが予測される。したがって放射線の線量増加によって生殖細胞中の転座型染色体の誘発頻度が高まると、その一部が次代に伝えられ、奇形の発生が増加する。このことから放射線による染色体異常のヒト集団におけるリスク推定のためには、転座型染色体の誘発頻度と線量との関係を霊長類の生殖細胞、特に放射線被曝の危険に晒される機会の最も多い精原細胞を用いて、出来るだけ精密に調べることが必要である。これまでに、ヒト、マーモセットおよびアカゲザルの3種の霊長類について研究が成されており、転座型染色体の誘発頻度が最大値を示す線量は種によって異なるが、いずれの場合にも山型(humpt-shap)の線量効果曲線を示すことが報告されている。最も注目すべき知見は、アカゲザルで得られたX線誘発相互転座の頻度が、他の哺乳動物に比べて著しく低いことである。1980年の国連科学委員会報告書では、アカゲザルで得られた相互転座の誘発率から、親が0.01Gyの放射線を被曝(低線量、低線量率)したとき、次代に生まれてくる先天異常児の出現頻度は100万出生児当り1人またはそれ以下と推定している。この値は、ヒトおよびマーモセットから得た転座誘発率から推定した同種のリスク、100万出生児当り2~10人と言う推定値よりはるかに小さい。この著しい差異が何によるかは解っていないが、相互転座に由来する遺伝的リスクを推定する上で、大きな問題を提示していることは事実である。

我々は、アカゲザル(*Macaca mullata*)と同種

that low dose rate irradiation gives only about one-tenth the yield of high dose-rate irradiation.

Thus, there is evidence for a pronounced dose-rate effect in the crab-eating monkey, in contrast with the situation for the rhesus monkey.

のカニクイザル(*Macaca fascicularis*)を用いて、精原細胞に生じた相互転座の線量効果関係を調べ、遺伝的リスク推定のための信頼度の高い基礎資料を得る実験を行った。

## 2. 研究方法

a. 実験材料：転座型染色体の自然発生率を調べる目的で、国立予防衛生研究所、武蔵村山分室で飼育されていた6頭のカニクイザル雄を用いた。また照射実験のためには当研究所、霊長類実験棟で飼育されていたカニクイザル雄を用いた。雄ザルの年齢は推定5歳以上で、全て野外(東南アジア)で捕獲されたものである。

b. r線照射：急照射(0.25Gy/分)および緩照射( $1.8 \times 10^{-5}$ /分、約0.024Gy/22時間/日)ともに $^{137}\text{Cs}$ 照射装置を用いて行った。

急照射実験においては、左右の精巣に0.25~3.00Gyの $\gamma$ 線を局部照射した。緩照射においては、サルを照射ケージに入れ、0.3~1.5Gyのr線を連日全身照射した。線量測定のために各個体の精嚢皮下に3~5本のTLDを照射開始前に包埋し、照射終了後にTLDを取り出して生殖腺線量の測定を行った。

c. 生殖細胞形成能の回復：照射による生殖細胞形成能の障害の回復を調べるために、急照射では照射前および照射後、また緩照射では照射前、照射中および照射後、2週間毎に電気刺激によって精液を採取し、精子数を数えた。

d. 染色体標本作成：精子数が照射前のレベルにはほぼ回復したことを確認したのち、左右の精巣を摘出し、精細管より侵出した生殖細胞を収集、固定し、空気乾燥法によって染色体標本を作成した。染色は動原体を特異的に染めるCバンド法を用いた。放射線による転座型染色体の頻度を過大評価することを避けるため、転座型染色体を持つ細胞のクローンのスコアを最小にする目的で、1サンプル(約60~70mg)の固定処理した精細管)当り最大50の精母細胞を検鏡した。

### 3. 結 果

a. 転座型染色体の自然発生頻度：6頭の非照射雄サルより10の精巣を摘出して転座型染色体の自然発生頻度を調べた結果、4700の精母細胞中4個の相互転座が検出された。この結果、自然発生頻度は0.09%と推定された。この頻度はアカゲザルで得られた自然発生頻度、0.08% (van Buul, 1980, 1983) と非常に近似しており、また他の哺乳動物で得られた値とも近似していた。

b. 高線量、高線量率照射による転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係：0.25Gyの線量率で1Gy（4頭）、2Gy（3頭）および3Gy（3頭）を精巣局部照射し、1精巣当り500の精母細胞を調べた。転座型染色体の頻度推定には、2

つの方法を用いた。1つは、definiteとpossibleの両者から頻度を推定する方法で、他は、definiteのみから推定する方法である。Possibleは、明確に転座型染色体と断定できないが、染色体の型と大きさから転座染色体と認定したものを言う。明確に転座型染色体と断定できたものの頻度は、1Gyでは1.9%、(3500細胞中65)、2Gyでは2.5% (3000細胞中74)、3Gyでは1.3% (3000細胞中40) であった。これらの頻度推定値は、definite+possibleのデータから得た値と有意に異なっていなかった（表1）。転座型染色体の出現頻度に関する個体間の差異は、1Gyでは1.4-2.1%, 2Gyでは1.9-3.3%, 3Gyでは1.4-1.6%とかなり小さく、また左右の精巣間の差異も殆ど認められなかった。

表1  $\gamma$ 線局部（精巣）急照射による転座型染色体の出現頻度

Dose (Gy)	Monkey	Testis	Number of cells observed	Number of translocations		Translocation configuration (Def.)			% translocation (Def. + Pos.)	
				Def.	Pos.	Ring	Chain	X-Auto		
1	No. 18	R	500	2	0	2	0	0	0.4	2.1
		L	500	19	0	15	3	1	3.8	
	No. 20	R	500	9	1	8	0	1	2.0	2.1
		L	500	11	0	9	1	1	2.2	
	No. 29	R	500	6	1	6	0	0	1.4	1.4
	No. 33	R	500	13	0	12	0	1	2.6	1.8
		L	500	5	0	4	0	1	1.0	
2	No. 22	R	500	12	1	10	1	1	2.6	2.8
		L	500	13	2	11	2	0	3.0	
	No. 28	R	500	6	1	4	2	0	1.4	1.9
		L	500	11	1	10	1	0	2.4	
	No. 30	R	500	18	0	17	1	0	3.6	3.3
		L	500	14	1	12	2	0	3.0	
3	No. 24	R	500	11	0	10	1	0	2.2	1.5
		L	500	2	2	2	0	0	0.8	
	No. 25	R	500	7	1	6	1	0	1.6	1.6
		L	500	7	1	5	2	0	1.6	
	No. 32	R	500	5	1	5	0	0	1.2	1.4
		L	500	8	0	7	1	0	1.6	

Def., definite.

Pos., possible.

転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係は、2Gyに最大頻度を示す山型の曲線を示した。 $\gamma$ 線によって誘発された転座の染色体構成のタイプを分析した結果、観察された179の転座型染色体のうち155 (86.8%) が環状型四価染色体であり、18 (10.1%) が鎖状型四価染色体で、残りの6転座はX染色体と常染色体との間の転座であった。環状型と鎖状型の比は9:1であり、この比はカニグザルにおける30:1と著しく異なるものであった。

c. 低線量、高線量率照射による転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係：0.25Gy/分の線量率で0.25Gy（3頭）および0.50Gy（3頭）を精巣局部照射し、1細胞当たり750の精母細胞を調べた。転座型染色体の頻度は前述と同様に、2つ方法によって推定したが、両者の推定値には有意な差は見られなかった。明確に転座型染色体と断定できたものの頻度は、0.25Gyでは

表2  $\gamma$ 線局部（精巣）急照射による転座型染色体の出現頻度

Dose (Gy)	Monkey No.	Testis	Number of cells observed	Number of translocations		Translocation configuration (Def.)			Translocations (%)	
				Def.	Pos.	Ring	Chain	X-Auto		
0.25	39	R	750	9	0	6	3	0	1.20	0.80
		L	750	3	0	3	0	0	0.40	
	41	R	750	3	0	3	0	0	0.40	0.40
		L	750	3	1	2	1	0	0.40	
	42	R	750	4	0	4	0	0	0.53	0.40
		L	750	2	0	2	0	0	0.27	
0.50	43	R	750	6	0	6 <sup>a</sup>	0	0	0.80	0.93
		L	750	8	0	7	1	0	1.07	
	44	R	750	9	3	9	0	0	1.20	1.40
		L	750	12	1	12	0	0	1.60	
	45	R	750	6	0	6	0	0	0.80	0.87
		L	750	7	0	6	0	1	0.93	

<sup>a</sup> Two translocations are ring hexavalents and the other 4 are ring quadrivalents. Def., definite; Pos., possible.

0.53%（4500細胞中24）、0.50Gyでは1.07%（4500細胞中48）であった。転座型染色体の出現頻度に関する個体間の差異は、0.25Gyでは0.40-0.80%、0.50Gyでは0.93-1.40%で有意ではなかった（表2）。観察された転座の大部分（92%）は環状型四価染色体であったが、0.50Gy照射群で2個の環状型六価染色体（図1）が観察された。環状型と鎖状型転座の比は13:1で、高線

量照射で得られた9:1と近似していた。

非照射群の転座型染色体の頻度、0.09%と0.10Gy照射群の転座型染色体の誘発頻度、1.86%および0.25Gyと0.50Gyのデータから、0-1Gyの低線量域における線量効果関係を求めたところ  $y = (1.08 \pm 0.45) \times 10^{-3} + (1.79 \pm 0.08) \times 10^{-2}D$  の直線式が得られた。この式で、Yは転座型染色体の頻度、DはGyで



図1 0.5 Gy照射群において観察された環状六価染色体（矢印）

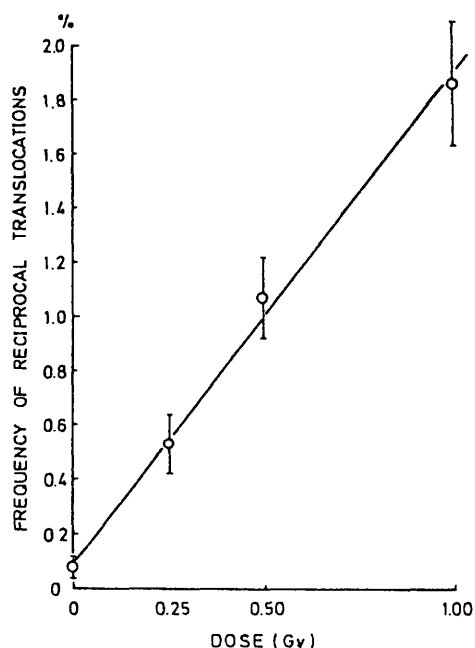


図2 高線量率照射による転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係

表した線量である。 $\chi^2$  検定の結果、転座型染色体の誘発頻度に関する観察値と期待値との間には有意差がないことから、0.10Gy 以下の低線量域では転座型染色体の誘発頻度と線量との関係は上記の直線式に非常によく適合することが明らかになった(図2)。

d. 低線量、低線量率照射による転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係:  $1.8 \times 10^{-5}$  Gy/分(約 0.024Gy/22 時間/日)の低線量率で 0.3Gy (3 頭)、1.0Gy (3 頭) 1.5Gy (2 頭)(生殖腺線量)を照射し、1 精巣当たり 1000-1250 の精母細胞を調べた。転座型染色体の誘発頻度は 0.3Gy では 0.15% (7500 細胞中 11)、1.0Gy では 0.27% (6000 細胞中 16)、1.5Gy では 0.33% (4000 細胞中 13) であった。誘発頻度に関する個体間の差異は 0.3Gy では 0.12-0.16%、1.0Gy では 0.25-0.30%、1.5Gy では 0.25-0.40% で個体差は認められなかった。観察されたすべての転座型染色体は環状型四価染色体で、鎖状型および X 染色体と常染色体間の転座は見られなかった。

転座型染色体の自然発生頻度 (0.09%) と合わせて極低線量率照射における線量効果関係を求めたところ、 $Y = (0.94 \pm 0.06) 10^{-3} + (0.16 \pm 0.07) \cdot 10^{-2} D$  の直線式がえられた。 $\chi^2$  検定の結果、転座型染色体の誘発頻度に関する観察値と期待値との間には有意差が認められなかった。したがって 1.5Gy 以下の低線量域では転座型染色体の誘発頻

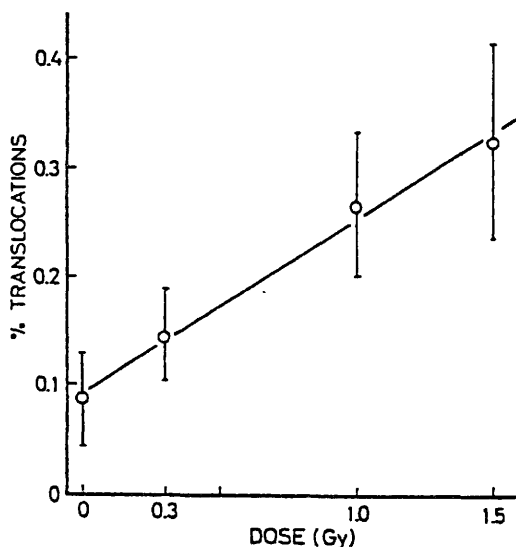


図3 低線量率照射による転座型染色体の誘発頻度に関する線量効果関係

度に関する線量効果関係は直線であることが明らかになった(図3)。

上式の直線回帰係数  $0.16 \times 10^{-2}$  は 1Gy 当たりの転座型染色体の誘発率を示すもので、この値を高線量率照射による 1Gy 当たり転座誘発率  $1.79 \times 10^{-2}$  と比較すると、カニクイザルの精原細胞を $\gamma$ 線照射した場合には低線量率照射による転座型染色体の誘発頻度は、高線量率照射時の約 10 分の 1 に減少することが明らかになった。(図4)

#### 4. 討 論

高線量、高線量率照射によって、カニクイザルで得られた $\gamma$ 線誘発相互転座に関する線量効果関係は、同じマカカ属に属するアカゲザルと同様に、2Gy に最大の誘発頻度を示す山型の線量効果曲線をしめした(図5)。このような山型の線量効果曲線は、図5に見られるようにヒトおよびマーモセットのみならずマウスなどでも報告されている。しかし転座型染色体の頻度が最大になる線量は種によって異なっている。特にマウスでは 6-7Gy 近辺で頻度が最大となりそれ以上の線量では転座型染色体の頻度は急激に減少する。このような山型の線量効果曲線は、幹精原細胞集団が突然変異

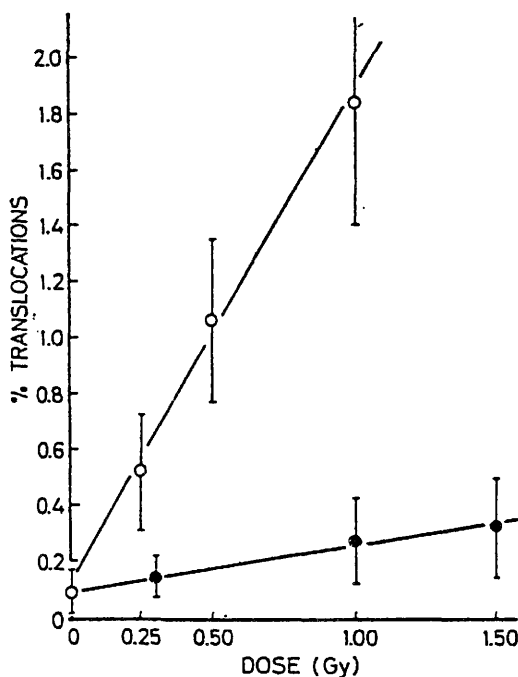


図4 転座型染色体の誘発頻度に関する線量率効果

○ 高線量率 (0.25 Gy/分) 照射,  
● 低線量率 ( $1.8 \times 10^{-5}$  Gy/分) 照射

と細胞死の両者に関して放射線感受性の異なる2つのタイプの細胞の混合集団であると仮定すると説明できる。すなわち突然変異に関して放射線高感受性の細胞は細胞死に関しても同様に高感受性であり、逆に突然変異をおこしにくい細胞は細胞死に関しても低抗性である。したがって転座型染色体を生じ易い細胞周期の短い幹精原細胞は、線量が高くなるにつれて死滅し、その結果転座型染色体の出現頻度が減少する。したがって線量効果曲線は転座型染色体の誘発率と細胞死による消失率の割合を反映しているものと考えられる。転座型染色体の出現頻度が最大になる点は誘発率と消失率とが丁度釣り合った線量のところである。

低線量域 (0-1Gy) における線量効果関係が直線であることが、他の研究と同様にこの実験で明かに示されたが、古典的な放射線生物学から、放射線誘発相互転座は一飛跡事象 (one ion-track) と二飛跡事象によって形成されるから、線量効果関係は直線二次モデル (Linearquadratic model) すなわち  $Y=a+bD+cD^2$  に適合すると考えられる。おそらく期待される通り転座型染色体は二飛跡事象によっても生ずるが、低線量域に

おける線量効果関係は、高線量域での曲線をゆがめると同じ原因すなはち細胞死によってゆがめられ、その結果、直線式に一致するという可能性が大きい。

線量効果曲線は転座型染色体の誘発率と細胞死による消失率の結果を示すものであるが、転座型染色体の出現頻度が線量の増加とともに直線的に増える線量域内で求められる直線回帰のスロープ (b) は単位線量当たりの転座型染色体の誘発率の推定値を示すものである。したがって直線回帰のスロープ (b) を比較することによって種々の動物について転座型染色体の誘発率に関する放射線感受性の差異を較べることができる。カニクイザルを用いた我々の実験結果から、カニクイザルの精原細胞の転座型染色体の誘発率 (b) は 1Gy 当たり  $1.79 \times 10^{-2}$  と推定された。この値は同じマカカ属に属するアカゲザル ( $b=0.79 \times 10^{-2}$ ) よりも有意に高かった。しかし転座型染色体の出現頻度が最高になる線量は両者ともに 2Gy であることから、おそらく精原細胞の細胞死に関する放射線感受性は同じと考えられるが、転座型染色体の誘発に関してはカニクイザルに比べてはるかに放射線低感受性であると思われる。一方マーモセットでは、単位線量当たりの誘発率 b は  $7.44 \times 10^{-2}$  と推定され、他の哺乳動物に較べても、またカニクイザルと較べても極めて高い感受性をもっていると思われる。さらに最大出現頻度を示す線量 (約 1Gy) が低いことから、マーモセットの精原細胞は細胞死に関しても高感受性であると思われる。マウスの精原細胞については種々の系統を用いて多くの研究が成されているが、少なくとも転座型染色体の出現頻度が線量の増加とともに直線的に増加する線量域内では単位線量当たりの誘発率 b は  $(1.39-2.61) \times 10^{-2}$  と推定されカニクイザルの b の値と大差ない。このことからマウス精原細胞における転座型染色体の誘発に関する放射線感受性はカニクイザル精原細胞のそれとほとんど差がないと考えられる。しかし最も顕著な違いは転座型染色体の出現頻度が最大になる線量である。マウスの場合、その線量は 6-7Gy で、これまで調べられた哺乳動物の中で最も高い線量を示している。この事実はマウス精原細胞の細胞死に対する放射線感受性が極めて低いことを示唆しているのかもしれない。さらに精原細胞集団中の感受性細胞と低抗性細胞との割合の違い、あるいは染色体切断および再結合の能力の違いといった要因がマウスと他の哺乳動物との

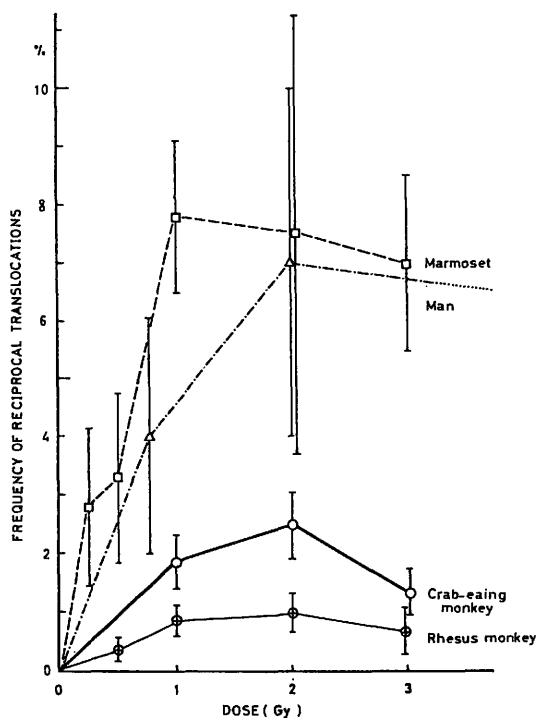


図5 種々の哺乳動物の精原細胞における放射線誘発転座型染色体の頻度に関する線量効果関係

違いを引き起こしているとも考えられる。ヒトを含めて他の実験動物における精原細胞の転座型染色体の誘発に関する放射線感受性はカニクザルの精原細胞とほぼ同じであると思われるが、強い順位をつけるるとすれば次のようである。(カッコは直線回帰係数  $b$  の値) : マーモセット (7.44) > ヒト (3.14) > マウス (2.61-1.39)  $\geq$  カニクザル (1.79) > ウサギ (1.39) > モルモット (0.98) > ゴールデンハムスター (1.02) > アカゲザル (0.78)

ヒトに対する放射線誘発染色体異常のリスクを推定するためには染色体異常、特に転座型染色体の誘発率に対する低線量率効果を明らかにすることが必要である。しかし、霊長類の精原細胞における転座型染色体の出現頻度に関する線量率効果の研究は皆無であった。我々はカニクザルの精原細胞を用いて、高線量率 (0.25Gy/分) および低線量率 ( $1.8 \times 10^{-5}$ /分)  $\gamma$ 線照射による転座型染色体の出現頻度に関する線量効果曲線から、低線量率照射による 1Gy 当たりの出現頻度 (0.16%) は、高線量率照射の時 (1.79%) の10分の1に減少することを明らかにした。一方、van Bulら<sup>1)</sup>はアカゲザルの精原細胞に $\gamma$ 線 1Gy を  $2 \times 10^{-4}$ Gy/分の線量率で照射した時の転座型染色体の出現頻度 (0.38%) は同じ線量を高線量率 (0.30Gy/分) のX線で照射した時 (0.83%) の2分の1以下であることを報告している。このことからアカゲザルに較べてカニクザルの方が著しく線量率効果が大きい。

マウス精原細胞を用いて、転座型染色体の誘発頻度におよぼす線量率効果に関する幾つかの研究が報告されている。Searleら<sup>2)</sup>は、最も低い線量率 (0.02R/分) での $\gamma$ 線照射による誘発頻度は、最も高い線量率 (86R/分) 照射による頻度の約9分の1であることを報告している。したがって、カニクザルで得られた低線量率照射による頻度の減少の程度は、マウスのそれと非常に近似していることが明らかになった。

1986年の国際科学委員会 (UNSCEAR) 報告では、転座型染色体に由来する先天異常のリスク推定のためのデータとして、カニクザルおよびアカゲザルの低線量率照射の実験結果を用いて、0.01Gy 当たり  $1 \times 10^{-6}$  と推定している。一方、ヒトおよびマーモセットのデータから  $15 \times 10^{-6}$  と推定している。したがって、低 LET 放射線による低線量、低線量率照射による誘発相互転座由来の先天異常児の出現頻度は 0.01Gy 当たり 1-

$15 \times 10^{-6}$  と推定される。

## 5. 結 論

カニクザルの精原細胞における $\gamma$ 線誘発相互転座の出現頻度に関する線量効果関係は、0.25Gy/分の高線量率急照射では、2Gyに最高の頻度を示す山型の線量効果曲線が得られた。1Gy以下の低線量域では、 $Y = 1.08 \times 10^{-3} + 1.79 \times 10^{-2}D$  の直線式に適合した線量効果関係が得られた。したがって、高線量率、低線量 (< 1Gy) 照射による転座型染色体の誘発率は 1.79%/Gy と推定される。また  $1.8 \times 10^{-5}$ Gy/分の低線量率で連続全身照射を受けた場合には、 $Y = 0.94 \times 10^{-3} + 0.16 \times 10^{-2}D$  の直線式に適合する線量効果関係が得られた。この結果、低線量率照射による転座型染色体の誘発率は 0.16%/Gy と推定される。したがって、低線量率 $\gamma$ 線照射による転座型染色体の誘発頻度は、高線量率照射に較べて約10分の1に減少することが明らかになった。低線量率照射による転座型染色体の誘発頻度から、相互転座由来の先天異常児の出現頻度は 0.01Gy 当たり  $0.72 \times 10^{-6}$  と推定される。

## 〔研究発表〕

- 1) Matsuda, Y., I. Tobari, T. Utsugi, J. Yamagiwa and S. Nakai : Study on  $\gamma$ -ray-induced reciprocal translocations in stem-cell spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*). XVth Intl. Cong. Genetics, New Delhi, 1983.
- 2) Matsuda, Y., I. Tobari, J. Yamagiwa, T. Utsugi, K. Kitazume and S. Nakai :  $\gamma$ -Ray-induced reciprocal translocations in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*), *Mutat. Res.*, **121** 125-130, 1984.
- 3) 戸張巖夫、松田洋一、山極順一、宇津木豊子、中井文武 : サル染色体異常の線量効果とリスク評価。第15回 放医研シンポジウム「放射線による遺伝損傷とリスク—その生物医学的アプローチ」報文集 (NIRS-M-54) : 277-286
- 4) Matsuda Y., I. Tobari, J. Yamagiwa, M. Okamoto and S. Nakai : Dose-response relationship of  $\gamma$ -ray-induced reciprocal translocations at low doses in spermatogo-

- nia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*). *Mutat. Res.*, **151**, 121–127, 1985.
- 5) Tobari, I., Y. Matsuda, T. Utsugi and S. Nakai : Induction of translocations in spermatogonia of the crab-eating monkey exposed to gamma-rays. Intl. Workshop of Re-evaluation of Hiroshima and Nagasaki Cases by Chromosome Aberration Analysis for Dose Assessment and Risk Evaluation, Kyoto, 1985.
  - 6) Tobari, I., Y. Matsuda and T. Utsugi : Dose-rate effect of  $\gamma$ -rays on translocation induction in spermatogonia of crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*). Intl. Symp. on Biological Effects of Low Level Radiation, Nanjing, China, 1986.
  - 7) Tobari, I., Y. Matsuda, G. Xiaohung, J. Yamagiwa, T. Uthugi, M. Kitazume and M. Okamoto : Dose-response relationship for translocation induction in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) by chronic  $\gamma$ -ray-irradiation. *Mutat. Res.*, **201**, 81–87, 1988.

## 2. 培養細胞によるヒト放射線突然変異のリスク推定の研究

佐藤 弘毅, 稲葉 浩子, 堀 雅明, 塩見 忠博

甲斐 (伊藤) 陽美 (遺伝研究部)

沢田 文夫, 森 明充, 東 智康 (化学研究部)

### Risk Estimation of Radiation Mutagenesis in Man by Using Cultured Mammalian Cells

Koki Sato, Hiroko Hama-Inaba, Tadaaki Hori, Tadahiro Shiomi, Akemi Ito-Kai.

Fumio Sawada\*, Mitsuoki Morimyo\* and Tomoyasu Higashi\*

Division of Genetics, \*Division of Chemistry

A number of mutants of mammalian cells have been isolated that are hypersensitive to the lethal effects of various kinds of DNA-damaging agents. Twenty-six mutants selected for their elevated sensitivity to mitomycin C which causes DNA interstrand crosslinks, have been classified into two complementation groups.

Six X-ray-sensitive mutants with a variety of cross-sensitivity to various chemical agents, showed peculiar recovery patterns of radiation-inhibited DNA synthesis which is quite different from those in wild type cells and exhibited a higher frequency of radiation-induced mutations than wild type cells.

A multiple mutagen-sensitive mutant has been established by sequential selection of one type of sensitivity to DNA-damaging agents. Firstly, mutants have been selected for the hypersensitivity to alkylating agents. One of these mutants has been proved to be hypersensitive to X rays and gamma rays as well. Secondly, the ultraviolet light sensitivity has been added to this mutant by using the cell suspension spotting method. Thirdly, the

mitomycin C sensitivity has been included in this mutant by using the replica plating technique. This multiple mutant is similar to respective single mutants with respect to the sensitivity to X rays, ultraviolet light and alkylating agents but is unusually hypersensitive to mitomycin C and 4-nitroquinoline-1-oxide. This mutant is useful for detecting environmental mutagens with high sensitivity by way of the growth inhibition area method.

Excision repair-deficient mutants between mouse and Chinese hamster cells have been compared. Mouse complementation group I has been found to correspond to Chinese hamster complementation group 5. The human genes that compensate the defect in mouse cells (ERCM2) and that compensate the defect in CHO cells (ERCC5) are both localized on human chromosome 13 and may be identical.

A transformation-competent and radiation-sensitive cell line has been established by the method of partial cell hybrid formation. Using this cell line, cloning of a human repair gene is in progress.

## 1. 緒言

昭和48年度—昭和57年度に実施された特別研究「培養細胞における放射線突然変異の線量効果に関する研究」において得られた成果は以下の如くである。すなわち、細胞懸濁液スポット法を考案してマウス培養細胞から多数の紫外線高感受性変異株を分離し、これらを4相細菌群に分類した。その第I相補性群に属するQ31株は除去修復を欠損しており、紫外線照射後のDNA合成阻害からの回復が野生株に比べて非常に悪く、また紫外線誘発突然変異頻度は同一線量あたりでも同一生存率あたりでも野生株よりもはるかに高かった。

マウス培養細胞の野生株についてガンマ線誘発突然変異の線量効果関係は25Rから300Rまではほぼ直線であり、線量(R)あたりの誘発率は $2.8 \times 10^{-7}$ であった。この細胞株から分離した電離放射線高感受性変異株M10についてのガンマ線誘発突然変異は0Rから70Rまで直線関係を示し、線量あたりの誘発率は野生株の約4倍であった。しかし、同一生存率あたりでは野生株とM10株との間に差が認められなかった。これらの成績に基づいて昭和58年度—昭和62年度においては誘発突然変異頻度に大きな効果をもつDNA修復系のより詳細な解析を行ない、放射線突然変異のリスク推定に資する。

## 2. 研究方法

a. 細胞および培養：マウス白血病細胞L-5178Y、電離放射線感受性変異株M10、紫外線感受性変異株Q31, US17TOR, US46TOR, US31TOR, XU1およびXUM1は10%子牛血清を含むフィッシャー培地で浮遊培養した。Ltk<sup>-</sup>aprt<sup>-</sup>(LTA), XL216, UV5TOR, UV20TOR, UV24TOR, UV41TOR、およびUV135TOR株は10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル最小基本培地で単層培養した。

b. DNA合成測定： $1 \times 10^5$ 細胞/mlに[メチル<sup>3</sup>H]チミジン(比活性6.7Ci/ミリモル)を1μCi/mlに加えて30分間保温する。その後、過剰の非放射性チミジンを加え、ガラス繊維フィルター(ワットマンGF/C)上に集め、氷冷5%三塩化酢酸で洗い、エタノールで洗ってからトルエンシンチレーターを用いて放射能を測定する。

c. X線照射：島津X線発生装置(200kV<sub>p</sub>, 20mA)により、0.5mm Cu+0.5mm Alフィルターを通して、線量率1Gy/分で、0.3%軟寒天培

地中にプレートした細胞を照射する。

d. 紫外線照射：東芝15W殺菌灯(254nm)を用いて0.4J/㎡/秒でG食塩水に懸濁した細胞を照射した後、軟寒天培地中へプレートする。

e. 各種薬剤処理後の生存率：それぞれの薬剤について、種々の濃度の薬剤と細胞を混じて軟寒天培地中にプレートし、2週間後のコロニー形成数を計数する。

f. 相補性検定： $1 \times 10^6$ のチオグアニンおよびウアバイン抵抗性CHO紫外線感受性変異株(UV5TOR, UV20TOR, UV24TOR, UV41TOR, あるいはUV135TOR)と $1.5 \times 10^6$ のマウス紫外線感受性変異株Q31を数時間培養した後、47%ポリエチレングリコール1000+10%ジメチルスルホキシドで1分間処理する。よく洗った後、24時間培養し、100mmシャーレあたり $6 \times 10^5$ 細胞をHAT( $1 \times 10^{-5}$ Mヒポキサンチン、 $1 \times 10^{-6}$ Mアミノプテリン、 $1 \times 10^{-5}$ Mチミジン)+2mMウアバインを含む培地にプレートする。このシャーレを5J/㎡の紫外線で照射して17日後の生存コロニー数を計数する。

g. DNA調製：プラスミドDNAはアルカリ溶解と塩化セシウム—臭化エチジウム平衡勾配遠心によって抽出精製した。細胞ゲノムDNAはRNaseA、プロティナーゼKおよびドデシル硫酸ナトリウム処理に引き続いてフェノール処理を行ない調製した。

h. トランスフェクション：50mMヘベス(pH7.1)+0.28M塩化ナトリウム溶液+1.4mMリン酸溶液に、プラスミドpSV2neo DNAとヒトDNAを含む等量の0.24M塩化カルシウム溶液を加えてDNAリン酸カルシウム共沈澱物を作り、その1.2mlを100mmシャーレの細胞に加えて20時間培養する。細胞を洗い、24時間後にneo+形質転換細胞を選択剤G418(ジェネティシン)を加えて培養する。10-12日後、G418抵抗性コロニー数を数えて形質転換頻度を算出する。

## 3. 結果

a. マイトマイシンC感受性変異株：マウス白血病L5178Y細胞からレプリカ法を利用してマイトマイシンCの致死作用に対して高感受性になった26変異株を分離した。これらの株は一官能基性のデカルバモイルマイトマイシンCに対しても交叉感受性を示したが、紫外線、X線、4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO)やメチルメタンサルホン酸(MMS)に対しては非感受性で

あった。これらの変異株は2相補性群に分類された。

b. X線感受性変異株：L5178Y 細胞からレプリカ法によってX線感受性変異株 LX821, LX827 および LX830 を分離した。これらの株は以前に分類した M10 株と異なっていて、4NQO や MMS に対して感受性ではない。またマウス乳癌 FM3A 細胞からX線感受性の SX9 および SX10 株を分離した。これらの株は別の相補性群に属し、ブレオマイシンおよび過酸化水素の致死作用に対して野生株よりも高感受性であった。

c. 一本鎖 DNA 切断の修復：アルカリ蔗糖勾配遠心法を利用してガンマ線による一本鎖 DNA 切断の再結合を調べた。その結果、M10 株と L5178Y 株における一本鎖切断の程度ならびにその修復にはあまり差のないことが明らかになった。

d. X線照射後の DNA 合成：X線照射により DNA 合成障害が起こるが、それは線量依存性であり、その程度は M10 株と L5178Y 株とではほぼ同じであった。しかし、保温による DNA 合成の障害からの回復には大きな違いが観察された。すなわち L5178Y 株での回復は高線量 (10-40Gy) では低く抑えられる (1Gy で 110%, 10Gy で 60%, 40Gy で 30%) のに対して、M10 株では高線量でも良く回復した (1Gy で 100%, 10Gy で 85%, 40Gy で 78%) (図1)。

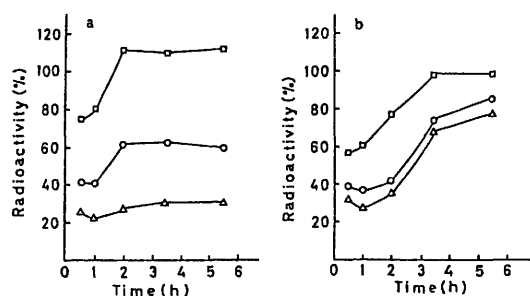


図1 1 Gy (□), 10 Gy (○)および40 Gy (△)のX線照射後のL5178Y(a)およびM10(b)におけるDNA合成の時間経過。縦軸は照射細胞におけるDNA合成と非照射細胞におけるDNA合成の比率。

e. 多重感受性変異株の作製：L5178Y 株よりレプリカ法により MMS 感受性変異株を2株分離した (頻度は細胞あたり  $10^{-4}$ ) が、そのうちの1株 M10 はX線ならびにガンマ線に対して高感受性であった。この株をN-メチル-N'

-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) で処理して突然変異頻度を高めた後、細胞懸濁液スポット法を利用して紫外線感受性変異株を選択した。880コロニーを調べた結果、2株が得られた (頻度：細胞あたり  $2.3 \times 10^{-3}$ )。このうちの1株 XU1 を MNNG で処理した後、レプリカ法を用いてマイトマイシン C (MMC) 感受性変異株を分離した。この場合、1100クローンを調べて1株が MMC 感受性であったので分離頻度は細胞あたり  $1 \times 10^{-3}$  である。この株を XUM1 と名づけた。

1) X線生存曲線：これらの変異株におけるX線生存曲線を図2に示す。10%生存線量 ( $D_{10}$ ) はL5178Y で 391R, M10 で 74R, XU1 で 69R, XUM1 で 60R であった。すなわち XUM1 株は出発株の M10 とほぼ同じX線感受性を保持していた。

2) 紫外線生存曲線：これらの変異株における紫外線生存曲線を図3に示す。図から明らかにように、 $D_{10}$  値はL5178Y と M10 株で 15.7J/ $m^2$ であり、XU1 で 2.2J/ $m^2$ であり、XUM1 で 1.8J/ $m^2$ であった。

3) 4NQO 生存曲線：4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO) 生存曲線を図4に示す。野生株に比べて、XU1 および XUM1 株は著しい高感受性を示し、M10 は中間の感受性を示した。 $D_{10}$  値はL5178Y で 28.1ng/ml, M10 で 4.8ng/ml, XU1 で 1.0ng/ml, XUM1 で 0.5ng/ml であった。

4) MMC 生存曲線：これらの変異株のマイトマイシン C (MMC) 生存曲線を図5に示す。

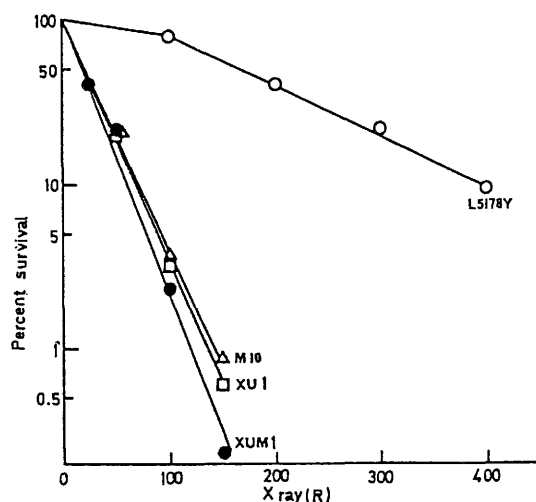


図2 L5178Y(○), XU1(□)およびXUM1(●)細胞のX線生存曲線。

野生株に比べて XUM1 株は極端に高感受性であり、M10 および XU1 株は中間の感受性を示した。D<sub>10</sub> 値は L5178Y で 130ng/ml であり、M10 で 48.1ng/ml, XU1 で 54.2ng/ml, XUM1 で 2.2ng/ml であった。

野生株における感受性を 1 にした場合の各変異株における相対的感受性を表 1 に示す。L5178Y 株に対して M10 株は MMS および MMC 感受性で約 3 倍、X 線および 4NQO 感受性で 5-6 倍高い。XU1 株は X 線、紫外線および MMC 感受性で 2-7 倍高く、4NQO 感受性で約 30 倍高い。XUM1 株は X 線および紫外線感受性で野生株より 7-8 倍高いが、4NQO と MMC 感受性では 50 倍以上高い。

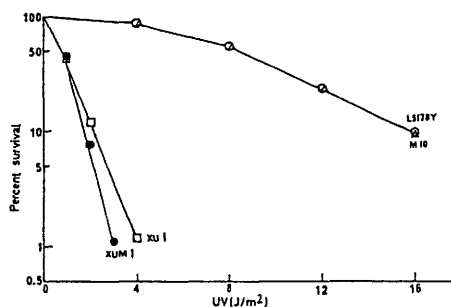


図 3 L5178Y(○), M10(△), XU1(□)および XUM1(●)細胞の紫外線生存曲線。

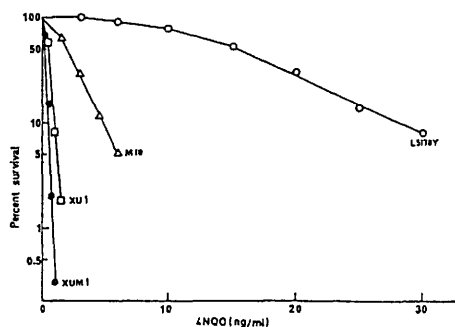


図 4 L5178Y(○), M10(△), XU1(□)および XUM1(●)細胞の 4-ニトロキノリン-1-オキソ生存曲線。

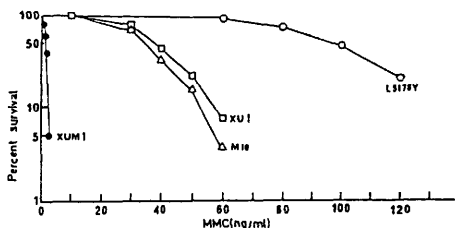


図 5 L5178Y(○), M10(△), XU1(□)および XUM1(●)細胞のマイトマイシン C 生存曲線。

性では 50 倍以上高い。

5) 細胞毒性試験への応用：上述のように XUM1 株の各種変異原に対する高感受性を利用すれば、鋭敏な環境変異原検出系を確立することができる。このため細菌などで使用されている増殖阻止帯法を利用した (図 6)。モデル実験として 4NQO および MMC の検出感度を L5178Y 株と多重変異原感受性株 XUM1 とで比較した。図 7 に見られるように XUM1 も野生株も変異原の濃度依存性に増殖阻止面積が大きくなるが、L5178Y 株では約 5ng/ml にしきい値が見られ、それ以下の濃度の変異原は検出できないが、XU

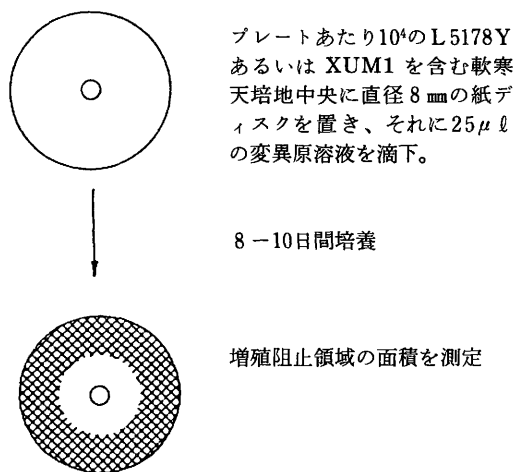


図 6 細胞増殖阻止領域測定による細胞毒性試験の図示。

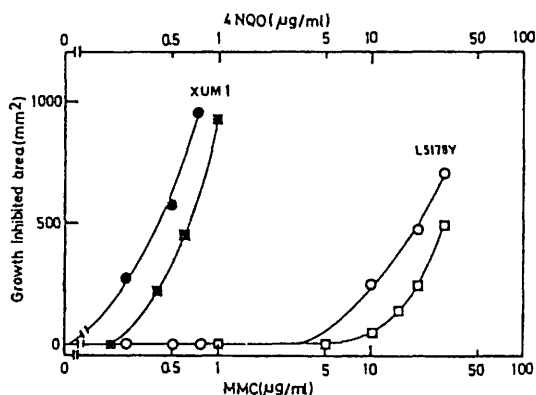


図 7 L5178Y (開印) および XUM1 (閉印) を試験株とした細胞毒性試験のモデル実験。縦軸は増殖阻止面積。横軸は紙ディスクに含まれる 4-ニトロキノリン-1-オキソ (丸印) (4NQO), あるいはマイトマイシン C (角印) (MMC) の濃度。

M1 株では 0.2ng/ml まで検出できる。このことは 4NQO と MMC に関しては、XUM1 株を用いた検出感度は野生株のそれよりも20倍以上高いことを示している。

6) 紫外線感受性相補性群：XU1 株での紫外線感受性が既知の相補性群のどれに属するかを知るために、US17 (I 群)、US46 (II 群) および US31 (III 群) と XU1 との間の雑種細胞を作製し、それらの紫外線感受性を調べて相補性検定を行なった。その結果、XU1 株は US46 および US31 株とは相補するが、US17 株とは相補しないことがわかった。このことは XU1 株の紫外線感受性は相補性群 I に属することを示している。

7) ヒト染色体上の補償遺伝子：マウス紫外線感受性除去修復欠損変異株 Q31 (I 群) と正常ヒトリンパ球の雑種細胞を作ると紫外線抵抗性となる。この雑種細胞から種々のヒト染色体分離株を得て解析した結果、ヒト第13染色体上に Q31 株の除去修復欠損を補償する遺伝子が位置することが判り、ERCM2 (excision repair complementing mouse 2) 遺伝子と名づけられた。

表1 各種変異原に対する変異株の野生株に対する相対的感受性

変異原	細胞株			
	L5178Y	M10	XU1	XUM1
X-Rays	1.0	5.2	5.6	6.5
MMS	1.0	2.9	N.T.	N.T.
UV	1.0	1.0	7.1	8.7
4NQO	1.0	5.9	28.8	51.3
MMC	1.0	2.7	2.4	58.7

相対的感受性：D<sub>10</sub> (L5178Y) / D<sub>10</sub> (変異株)。N. T. : 未定。

8) 異種細胞変異株間の相補性：ローレンスリバモア国立研究所のトンプソン博士との共同研究によって、チャイニーズハムスター CHO 細胞の紫外線感受性 UV5 (1 群)、UV20 (2 群)、UV24 (3 群)、UV41 (4 群)、および UV135 (5 群) とマウス Q31 (I 群) との間の相補性検定を行った。表2に見られるように、Q31 株と CHO の 1-4 群変異株との雑種細胞はすべて紫外線抵抗性となるが、Q31 株と UV135 株 (5 群) との雑種細胞は紫外線感受性であった。このことはマウス細胞相補性群 I と CHO 細胞相補性群 5 とは同じ相補性群に属することを示している。さらに UV135 変異を補償する遺伝子 (ERCC5) がヒト第13染色体上に位置している事

表2 紫外線感受性の CHO 変異株とマウス変異株 Q31 との間の相補性検定<sup>a</sup>

細胞の組合せ	非融合	融合
Q31 × UV5-TOR	0,0	19,22
Q31 × UV20-TOR	0,0	8,8
Q31 × UV24-TOR	0,0	40,44
Q31 × UV41-TOR	0,0	13,14
Q31 × UV135-TOR	0,0	0,2,0,2

a : 数字は 5 J / m<sup>2</sup> の紫外線照射後の生存コロニー数。

実は、この関係を支持する。

f. 形質転換：突然変異誘発に重要な役割を果している DNA 修復系を理解するためには、修復遺伝子のクローニングが有力な手段となる。このためにはマウス除去修復欠損株にヒト DNA を導入して形質転換細胞を得る必要がある。そこで多重変異感受性株 XUM1 にプラスミド pSV2neoDNA と HeLa DNA をリン酸カルシウム法によって導入したところ、G418 抵抗性 (neo+) の頻度は細胞あたり 10<sup>-7</sup> 以下であり、対照のマウス繊維芽細胞 LTA の 10<sup>-3</sup> と比べてあまりにも低い。この導入効率の低い XUM1 株を高い細胞に改造するために部分細胞雑種形成法を考案した。すなわち、導入効率の高い LTA 細胞と低い XUM1 細胞の細胞雑種は DNA 導入効率が高いので、高い導入効率は優性形質である。しかしこの雑種細胞は XUM1 細胞の示した各種変異原に対する高感受性を失っていた。これは LTA 由来の対応する遺伝子の働きによると考えられるので、もしも高導入効率に関与する遺伝子と変異原感受性を支配する遺伝子が別の染色体に存在するならば、細胞雑種から各種の染色体分離体を得れば、その中には高導入効率を示しつつ、しかも変異原感受性の株がある筈である。この原理に基づいて得られたのが XL216 株である。この株ならびに LTA 株を用いて形質転換の最適条件を検討した。図8に見られるように HeLa DNA と pSV2neo DNA の総量が 20μg となるようにしてリン酸カルシウム法によって neo+ (G418 抵抗性) 形質転換頻度を比較した。プラスミド DNA 単独では DNA 量の増加につれて形質転換頻度も徐々に増加するが、20μg では飽和に近い。これに対して HeLa DNA を加えると、形質転換頻度の大幅な促進が見られ、LTA 細胞でも XL216 細胞でもプラスミド DNA 2μg と HeLa DNA 18μg を混じ

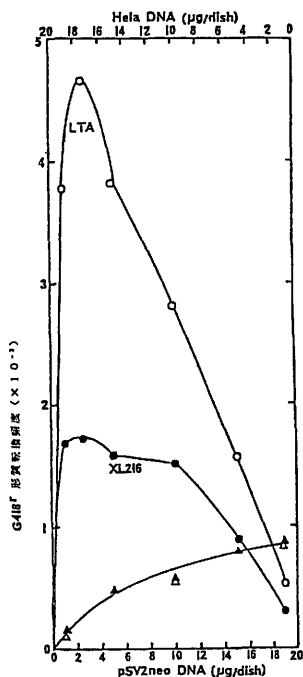


図8 総DNA量を20 $\mu$ gに固定した時のDNA導入効率の変化。

ヒトHeLa細胞のDNAとプラスミドpSV2neo DNAの割合を変えて導入した。

LTAは導入効率の良い細胞、XL216は修復欠損を示す細胞雑種。

プラスミド由来のneo遺伝子が細胞に取り込まれると、薬剤G418に抵抗性となる。

G418抵抗性となった細胞の頻度を示してある。

○、●はHeLa DNAとプラスミドpSV2neo DNAを混ぜて導入した場合、△▲はプラスミドpSV2neo DNAを単独で導入した場合。

LTA、XL216、いずれの細胞でもHeLa DNAを18 $\mu$ g、プラスミドDNAを2 $\mu$ g位の割合で混ぜた時、DNA導入効率が良い。

た場合に形質転換頻度が最大になる。この条件を使って、XL216細胞にHeLa DNAとpSV2neo DNAをリン酸カルシウム法で導入し、まずG418抵抗性形質転換細胞を得た。この中から紫外線抵抗性クローンを選択した。その頻度は $7.5 \times 10^{-5}$ であり、これに対して同条件下での復帰突然変異頻度は $10^{-7}$ 以下であった。このことはHeLa DNA導入によって得られた紫外線抵抗性クローンは真の第一次形質転換株であることを示しており、復帰突然変異株である可能性は低い。現在、第二次形質転換細胞を得るための準備を進めている。

#### 4. 考察

マウス白血病細胞L5178Yを用いた理由は、継代が容易であること、増殖が速いこと、平板効率が低いこと、およびレプリカ法が利用できることであり、これらの利点を生かして各種の変異原感受性変異株の分離に成功している。その一つであるマイトマイシンC感受性変異株は2相補性群に分類されており、おそらくDNA鎖間架橋修復の欠損と考えられる。この点の解明ならびに他の架橋剤であるソラレン光付加やシスプラチンに対する致死ならびに突然変異反応は今後の課題である。

X線感受性変異株も6株分離され、少なくとも

2相補性群があるが、各種の化学物質に対する交叉感受性と二本鎖DNA切断の修復の研究は緊急になされねばならないが、これらは共同研究として進行中である。またX線照射後のDNA合成阻害とその回復の機構の解明も今後の課題である。

多重変異原感受性変異株については、X線および紫外線感受性は単独変異株のそれらと同様であるが、4NQOおよびMMCについては感受性が極度に増大している。これはM10における4NQO感受性とQ31における4NQO感受性は同じ細胞内では相乗効果を示すため、またM10はそれ自体でもある程度MMC感受性を示し、これに別のMMC感受性機構が加わることで高度の感受性となるためと考えられる。

紫外線感受性変異株はCHO細胞およびL5178Y細胞からそれぞれ独立に分離されており、前者で6相補性群に、後者で4相補性群に分類されている。これらの変異株の間の相補性検定は国際共同研究として進行中であり、その一つの結果として、マウス紫外線感受性相補性群IはCHO相補性群5と同じ機能をもっていることが明らかにされた。さらにそれぞれの欠損を補正するヒト遺伝子ERCM2とERCC5 (excision repair complementing Chinese hamster 5) がともにヒト第13染色体上に位置することも示された。

マウスL5178Y細胞は有用性の高い細胞であ

るが、欠点としてはリン酸カルシウム法による DNA 導入効率が非常に低いことがある。このため非常に早い時期に変異原感受性変異株を分離しながら、遺伝子クローニングに手間どってしまった。幸い部分細胞雑種形成法によって DNA 導入効率の高い変異株が得られ、遺伝子クローニングは順調に進行中である。

## 5. 結 論

マウスの培養細胞から電離放射線感受性変異株、紫外線感受性変異株、架橋剤感受性変異株、アルキル化剤感受性変異株などを分離して、それぞれの性質を明らかにしてきた。このうちで、紫外線感受性変異株については除去修復欠損であることを明らかにした。これらの単一変異原感受性変異株以外に、多重変異原感受性変異株の分離にも成功した。すなわちこの株は電離放射線、紫外線、架橋剤、アルキル剤および 4-ニトロキノリン-1-オキシドに対して高感受性である。この株を使用し増殖阻止面積を測定することで環境変異原を鋭敏かつ容易に検出できることを示した。部分的細胞雑種形成法を考案して形質転換効率が高い紫外線感受性除去修復欠損細胞の作製に成功し、この細胞を用いて除去修復遺伝子のクローニングに着手している。

## 〔研究発表〕

- 1) Shiomi, T., N. Hieda-Shiomi and K. Sato : UV- and X-ray-sensitive double mutants of mouse L5178Y cells are synergistically more sensitive to 4-nitroquinoline-1-oxide than is either of the single mutants. *Mutation Res.*, **108**, 395-404, 1983.
- 2) Hama-Inaba, H., N. Hieda-Shiomi, T. Shiomi and K. Sato : Isolation and characterization of mitomycin-C-sensitive mouse lymphoma cell mutants. *Mutation Res.* **108**, 405-416, 1983.
- 3) Hama-Inaba, H., N. Hieda-Shiomi and K. Sato : Inhibition and recovery of DNA synthesis after X-irradiation in radiosensitive mouse-cell mutants. *Mutation Res.*, **120**, 161-165, 1983.
- 4) Sato, K., N. Hieda-Shiomi and H. Hama-Inaba : X-Ray-sensitive mutant mouse cells with various sensitivities to chemical mutagens, *Mutation Res.*, **121**, 281-285, 1983.
- 5) Hori, T., T. Shiomi and K. Sato : Human chromosome 13 compensates a DNA repair defect in UV-sensitive mouse cells by mouse-human cell hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5655-5659, 1983.
- 6) Sato, K. and H. Hama-Inaba : Repair of DNA single-strand breaks in radiation-sensitive mutants of mouse cells, *Mutation Res.*, **140**, 159-163, 1984.
- 7) Sato, K. A. Ito, T. Shiomi, H. Hama-Inaba, H. Ishikawa, T. Yoshizumi and T. Nakazawa : X-Ray-sensitive mutants of mouse mammary carcinoma cells are hypersensitive to bleomycin and hydrogen peroxide. *Jpn J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 456-461, 1986.
- 8) Sato, K., A. Ito, N. Hieda-Shiomi, T. Shiomi and H. Hama-Inaba : Cross-sensitivity to DNA-damaging agents in radiation-sensitive mutants of murine leukemia cells, *J. Radiat. Res.*, **27**, 378-385, 1986.
- 9) Shiomi, T., N. Hieda-Shiomi, H. Hama-Inaba, A. Ito and K. Sato : Mutagen detection with a mouse line containing 3 distinct mutations conferring sensitivity, *Mutation Res.*, **182**, 223-227, 1987.
- 10) Thompson, L. H., A. V. Carrano, K. Sato, E. P. Salazar, B. F. White, S. A. Stewart, J. L. Minkler, and M. J. Siciliano : Identification of nucleotide-excision-repair genes on human chromosome 2 and 13 by functional complementation in hamster-human hybrids. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **13**, 539-551, 1987.

### 3. 放射線による遺伝障害の検出システムの 開発に関する研究

岡 本 正 則, 北 爪 雅 之 (技術部動植物管理課)  
戸 張 巖 夫 (遺伝研究部)

## Effects of Ionizing Radiation on Male Germ Cells of Crab-eating Monkey

Masanori Okamoto, Masayuki Kitazuma and Izuo Tobari\*  
Division of Technical Services and\* Division of Genetics

Effects of ionizing radiation on sperm concentration, testicular volume and sperm shape of the crab-eating monkey and mouse were studied by using acute and low dose-rate  $\gamma$ -rays as well as X-rays. The crab-eating monkeys, all were more than 5 years age, were acutely irradiated with 0.25–3.00 Gy using  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays at a dose-rate of 0.25 Gy/min. Semen was collected every 2 weeks before and after irradiation by electrostimulation. The sperm concentrations were decreased with time after irradiation, the degree of the decrement, however, varying markedly in animals exposed to different doses of  $\gamma$ -rays. The time at which the sperm concentrations were reached the lowest was also dependent upon the dose to which animals were exposed. The result shows that the dose-effect relation for sperm concentrations was linear one. When the present results were compared with those obtained in the previous studies with mouse and golden hamster, the sensitivity of spermatogenic cells to cell killing by  $\gamma$ -rays in the monkey was the highest and that in mouse was lowest. In order to estimate low dose-rate irradiation on the sperm concentrations, testicular volume and sperm shape, the crab-eating monkeys were continuously given whole-body irradiation with

0.3–1.5Gy of  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays at  $1.8 \times 10^{-5}$  Gy/min. Before, during and after irradiation, semen was collected every 2 weeks. Remarkable changes in sperm concentrations and testicular volume were not found at 0.3 Gy. Above 1 Gy, the sperm concentrations were markedly changed with time after irradiation, but the effects of low dose-rate irradiation on spermatogenic activity seemed to be different from those of acute irradiation. The changes in the sperm concentrations and testicular volume following X-irradiation at the dose-rate of 0.32 Gy/min showed that the killing effects of X-rays are apparently higher than those of  $\gamma$ -rays. By using the monkeys irradiated with chronic  $\gamma$ -rays the induction of abnormal head shapes of their sperm was examined. The peak yields of sperm abnormalities were only 1.5–1.8% at 0.25–0.50 Gy, being clearly lower than those in the acutely irradiated animals. Comparative studies on the induction of sperm abnormalities of the monkey, mouse and hamster showed that the yield of sperm abnormalities induced by  $\gamma$ -rays was comparable with that in the hamster, while the frequency in the mouse was markedly higher than that in the monkey.

## 1. 緒言

ヒトに対する放射線の遺伝的リスクを推定するために必要なデータは、ヒトについてのデータを直接求めることができないため、従来は主としてマウスのデータを基礎としていた。しかし、マウスのデータは、ヒトに外挿するには問題点もあることが明らかとなり、リスク推定の見地からはヒトに近縁なサル類を用い生殖細胞におよぼす放射線の遺伝的影響に関する定量的データを得ることが重要であると考えられる。さらに哺乳動物の精子、精子形成に対する放射線障害研究は、マウスを中心として多く行われているが、主として細胞動態学的研究が中心であり、精子濃度等についての詳細な報告はない。一方、サル類を放射線遺伝学的研究に使用するためには、マウス等の実験動物として確立された種とは異なり多くの検討すべき課題を有している。以上の観点より、本研究ではサル類の中で生殖生理学的にヒトに近縁種であるカニクイザルを用い、放射線照射後の雄性生殖細胞におよぼす遺伝的影響を検討することを目的として、1) 放射線遺伝学的研究を目的としたカニクイザルの実験動物学的検討、2)  $\gamma$ 線およびX線照射後の精巢上皮細胞に対する放射線障害および回復の指標として精子濃度、精巢容積、精子形態異常の出現頻度の経時的変動について研究を実施した。

## 2. 研究方法

### a. 実験動物

1) 精子濃度および精巢容積の経時的変動に関する実験にはカニクイザルを用いた。カニクイザルは霊長類実験施設において4カ月～3カ年間維持管理を行った推定年齢5歳以上の雄で、すべて野外で捕獲されたものである。また、精巢機能について長期間にわたる経時的変動を調査する目的で、対照として非照射ザルについても並行して検討を行った。

2) 精子形態異常に関する実験には、上記実験に用いたカニクイザルおよび当所で生産した8週齢以上のC3H、C57BLおよびBC3F1系マウスを用いた。

b.  $\gamma$ 線照射：線源は $^{137}\text{C}\cdot\gamma$ 線(48.1TBq)を用い、以下の通り照射を行った。

1) 急照射：両側精巣部に同一線量で生殖線線量が0.25、0.50、1.0、2.0、および3.0Gyで照射(0.25Gy/分)した。

2) 緩照射：動物は照射用アイソレータージ内に收容し、 $1.8\times 10^{-5}\text{Gy/分}$ (0.024Gy/22時間/日)で精巣の総蓄積線量が0.3、1.0、1.5および2.5Gyで照射した。

c. X線照射：線源はX線(200kVp, 20mA, 0.5Cu+0.5Al)を用い、以下の通り照射を行った。

1) 両側精巣部に同一線量で精巣吸収線量が0.25、0.50および1.0Gy(0.32Gy/分)で照射した。

2) マウスについても上記同様に1.0、2.0および3.0Gy(0.32Gy/分)で照射した。

### d. 精液の採取および性状検査

1) 精液の採取：精液はサル直腸内に我々が考案、製作した環状多極型の電極棒を挿入、断続的に通電(平均採取条件、AC100V, 5A)し、射精を誘起した。精液は室温に静置し、液化させた後、精液量、凝固物量の測定を行った。凝固物は1%トリプシン液にて溶解した。

2) 精子濃度：精子濃度の測定は希釈・染色後、血球測定法に準じて血球計算盤により1ml当りの濃度を算定した。

3) 精巢容積：精巢容積はノギスを用い、左右の精巣サイズを測定し、測定値の積(長径×短径×厚さ)として算出した。また、カニクイザルの精液性状については不明の点も多いため、非照射群より得た精液の性状検査(精液量、射出当りの総精子数、運動性およびpH)も実施した。

4) 精子形態異常：カニクイザルについては上記方法により精液を採取した。マウスについては照射後6週目に解剖し、精巣上体尾部を切断して37℃に保温したホールガラス内の生食液1ml中に入れ、ハサミで数片に細切して均一な精子懸濁液とした。染色は10%エオジン染色あるいは10%エオジンY・ファストグリーン・ナフトールイエロー染色した後、オイキット封入した。鏡検は600倍または1000倍の強拡大で行い、1実験区当たり3枚の標本を作成し、1枚当たり1000精子を観察した。

## 3. 結果および討論

### a. カニクイザルの実験動物学的検討

1) 精液性状検査：非照射群4頭より得た結果、精液量0.2(0.05～0.70)ml、精子濃度 $277.08(5.60\sim 1889.60)\times 10^6/\text{ml}$ 、総精子数 $55.42(0.28\sim 1322.72)\times 10^6$ /射出となり、精液量と精子濃度は負の相関を認めた。採取後、精子運動性を測定した結果、最活発前進運動を示す精

子の割合が各々採取後40分-70%、60分-60%、80分-50%、120分-50%であったが、マウス体外受精用合成培地内に懸濁した実験では培養開始時のそれは80%、8時間培養後においても50-60%と長時間良好な運動性を維持していることが知られ、カニクイザル精子は体外での強さ(寿命)が優れた種と考えられた。精液内の凝固物量は0.3(0.1-0.5)mlで、分泌の有無と採精条件、個体との間の相関は認められなかった。また、精液のpHは6.8であった。以上より、今回の精液採取法は技術が簡便であり、同一個体より継続して採取可能なこと、および動物への刺激が少ないことなど本研究に有効な方法であることが分った。

2) 非照射群の精子濃度・精巢容積値の年時変動: 4個体について1-2.5年間経時的推移を測定した結果、(図1)、精子濃度は $10^7 \sim 10^9$ /mlの変動範囲にあること、精子形成において季節の変動は認められないこと、および個体間の差が大きいことが明らかになった。また、精巢容積では5歳以上においても性成熟に伴う容積の増大があ

ること、左右精巢間の差は小さいこと、および季節変動はないことが知られた。カニクイザルは同じマカク属のアカゲザル、ニホンザルが季節繁殖動物であるのに対し、季節性を持たないことがすでに知られているが、本結果のように精子濃度の調査から明らかにした報告例はなく、注目すべき結果であると考ええる。

b. 精子濃度および精巢容積におよぼす放射線の影響

1)  $\gamma$ 線急照射: 各照射区の精子濃度における精子生存率および回復期間は表1に示す通りであった。0.25, 0.5Gyの低線量域では測定値に顕著な変動が認められず、回復は短期間であった。これに対し、1-3Gyの中・高線量域(図2-A, B)では精子濃度が急激に低下、ほぼ16週で最低値に達し、再び増加、回復に至る過程が知られた。精巢容積では精子濃度と同様の傾向を示し、縮小後再び回復したがその変動は緩やかであった。これらの結果、精子濃度についての線量効果関係は図3に示す通り、直線の関係が得られた。

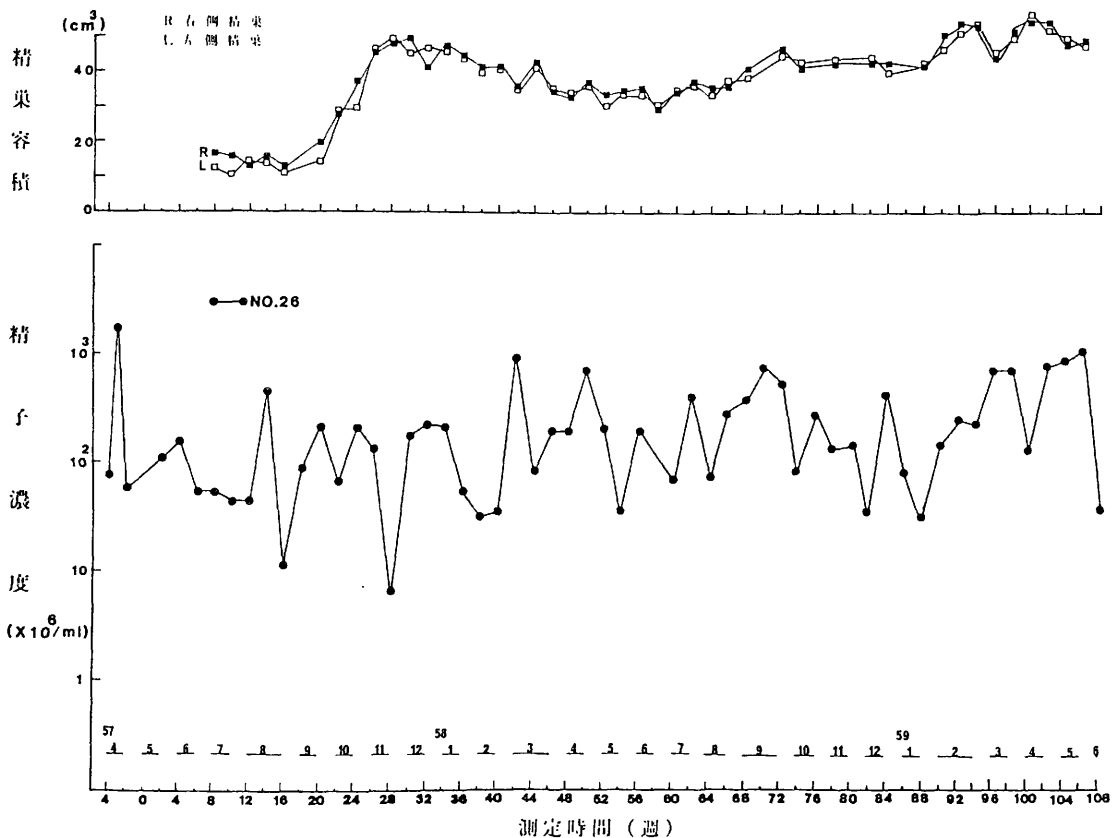


図1 非照射ザルの精巢容積及び精子濃度

表1 カニクイザル精子生存率および回復時間におよぼすX線と $\gamma$ 線照射の影響

線源	照射方法 線量 (Gy)	線量率 (Gy/min)	実験動物数	精子生存率* (%)	平均回復時間 (週)
X線	精巣局部急照射	0.32			
	0.25		3	1.5	31
	0.50		2	3.8	34
	1.0**		1	0.5	60
$\gamma$ 線	精巣局部急照射	0.25			
	0.25		3	45.3	20
	0.50		3	34.2	22
	1.0		4	10.8	36
	2.0		4	3.3	38
	3.0		4	0.6	42

\* 生存率=照射後の最低精子濃度の平均値/照射前の精子濃度の平均値

\*\* 1頭のみ回復、他の1頭は未回復

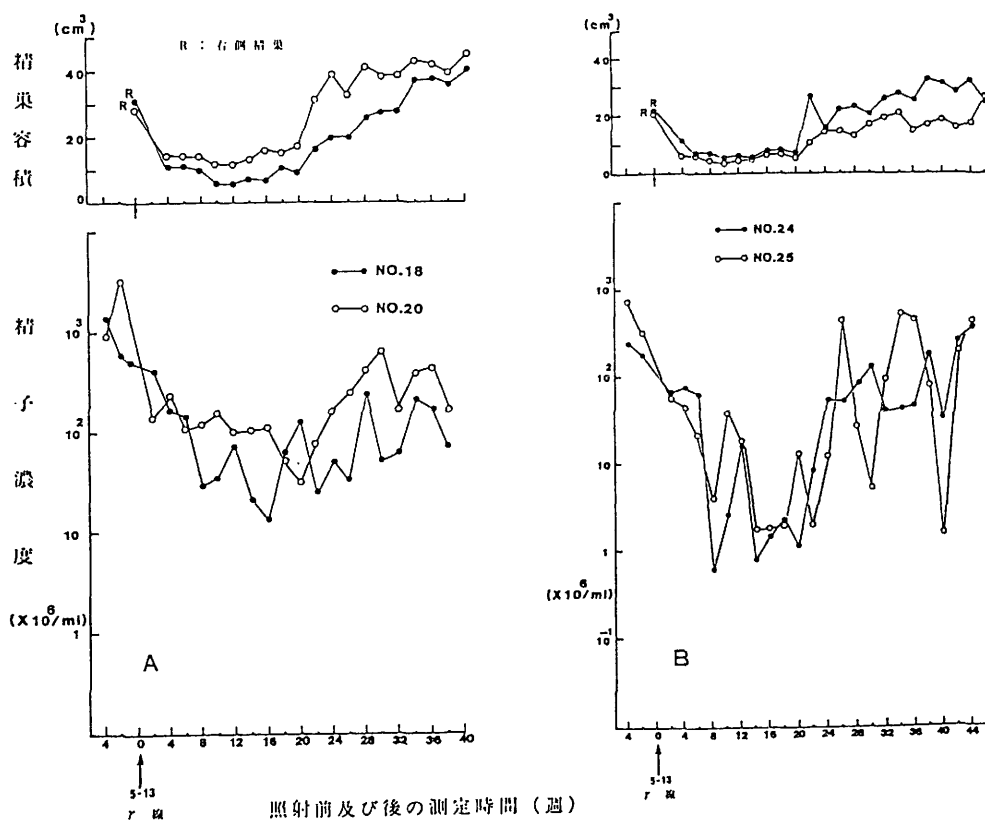


図2  $\gamma$ 線急照射によるカニクイザル精巣容積および精子濃度の変動,  
A: 1Gy 照射, B: 3Gy 照射, 矢印: 照射時

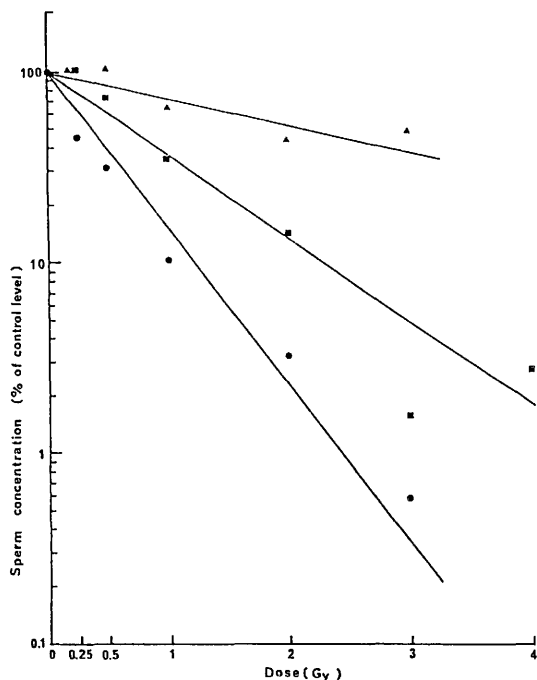


図3 精子濃度に関する線量効果関係,

▲: マウス, ■: ハムスター, ●: カニクイザル

また、種差を検討するため、我々のマウスおよびゴールデンハムスター精子についての同様の実験結果と比較したところ、雄性生殖細胞に対する放射線の細胞致死作用はカニクイザル>ハムスター>マウスの順となり、種差が大きく、カニクイザルがこれらの種では最も高感受性であることが明らかとなった。

2)  $\gamma$  線遠照射: 本結果はまとめて表2に示

した。精巣蓄積線量が0.3Gy区の精子濃度、精巣容積は照射の影響と思われる変動は顕著に認められなかった(図4-A)。1Gy区(図4-B)、1.5Gy区では照射終了後にも精子濃度の低下が続き、また2.5Gy区では長期間 $10^4/\text{ml}$ 以下または無精子の状態が継続し、96週目に1個体が回復したに止った。これらの結果から精子濃度、精巣容積およびこれらの回復期間を指標とした場合、高線量率の結果と比較した線量率依存性は明確ではないことが示唆された。しかし、サル類による本研究と同様の研究は、アカゲザルを用いた中国での報告(1980, 82)があるのみで、結果の詳細な検討は困難なこと。さらに、サル類の生殖機能系におよぼす長期間の全身照射の影響は、単なる線量率の差だけではなく、他の多くの因子も複雑に関与していることが推察されることから、今後は本研究より得た他の結果とも合わせ検討を要する。なお、実験計画段階で予想されていたサルの生理学的面におよぼす全身照射の影響は、動物の観察および衛生検査からは認められなかった。

3) X線急照射: 照射後の精子生存率、回復時間については、 $\gamma$ 線の結果と対比し表1にまとめて示した。また、精子濃度、精巣容積の変動については0.25、0.5および1Gy区が図5-A、B、Cに示してある。X線および $\gamma$ 線急照射の結果より精子生存率は $\gamma$ 線>X線であり、回復期間はX線> $\gamma$ 線であることが明らかとなった。さらに、カニクイザルの精子形成過程のうち最も高感受性の細胞は、照射後に最低精子濃度に到達する時期が12~14週頃であることから推察すると、精原細胞期であることが分かり、すでに報告された他の

表2 カニクイザル精子生存率および回復時間におよぼすガンマ線低線量率全身照射の影響

照射方法 線量(Gy)	線 量 率 (Gy/min)	実験動物数	精子生存率* (%)	平均回復時間 (週)
低線量率全身照射				
	$0.18 \times 10^{-4}$			
0.3		3	8.2	22
1.0		3	0.4	26
1.5		2	0.1	46
2.5		3	無精子	96**

\* 生存率=照射後の最低精子濃度の平均値/照射前の精子濃度の平均値

\*\* 1頭のみ回復、他の2頭は未回復

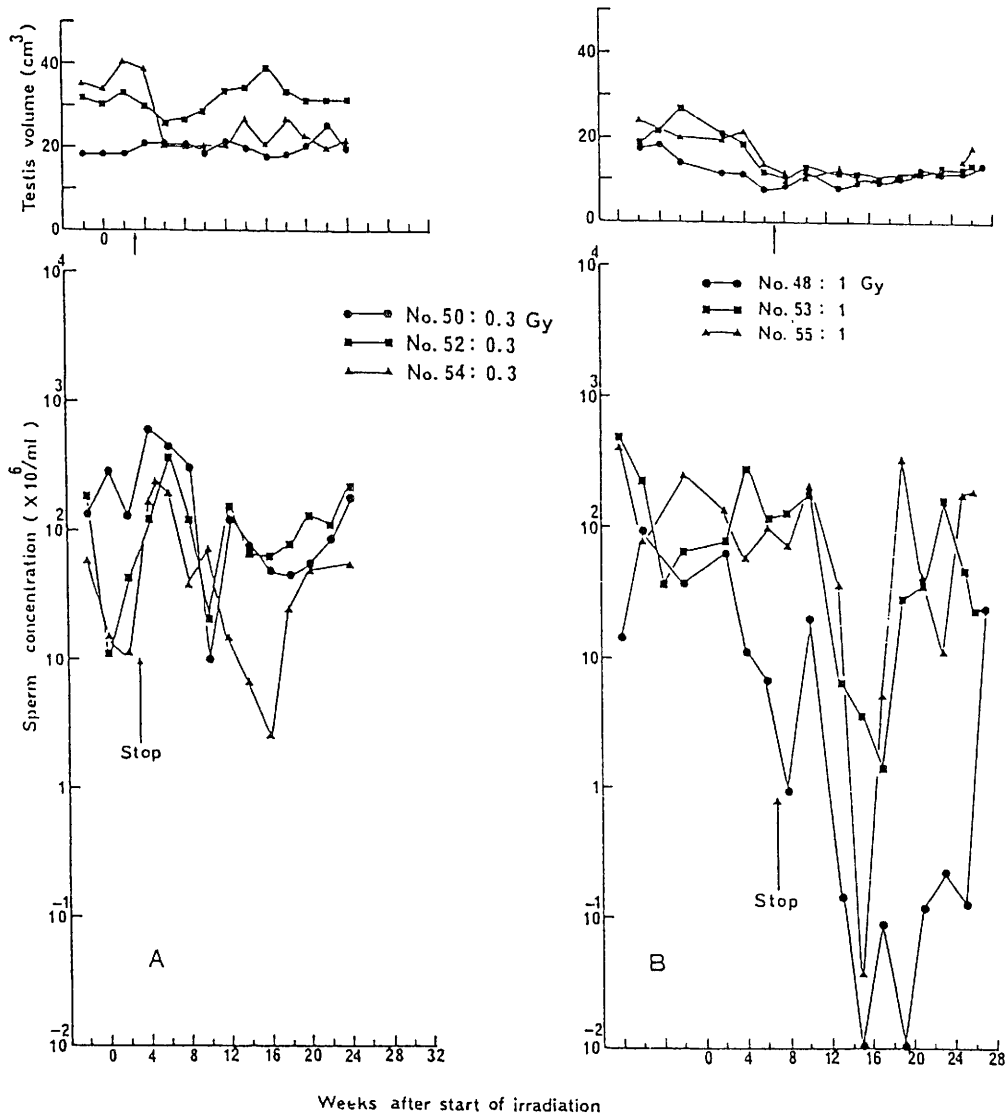


図4  $\gamma$ 線低線量率照射によるカニクイザル精巣容積および精子濃度の変動、  
A:0.3 Gy 照射, B:1Gy 照射, ○:照射開始, 矢印:照射終了時

動物種の結果とも一致した。なお、X線、 $\gamma$ 線精巣照射後の身体的影響および陰のう皮膚への局所的影響については、特に認められなかった。

### c. 精子形態異常におよぼす放射線の影響

1) 精子形態異常の型と感受期: 精子形態異常の型は頭部、頸部、複合(頭部+頸部)およびその他(中片部、尾部)の異常に分類されるが、遺伝損傷テストのために重要なのは頭部異常である(図6)。まず、C3H, C57BL および BC3F1 系マウスにX線を急照射、さらにカニクイザルに $\gamma$ 線を急照射および緩照射して、マウスでは照射

後6週目、カニクイザルでは照射後2週間毎に精子を採取して観察した結果、放射線に感受性なのは主に頭部異常であった。また、放射線に対する感受期がカニクイザルでは急照射後6週間(3Gy)および8週間(0.25, 0.50, 1, 2Gy)でピークが認められる(図7)。すなわち、カニクイザルの頭部異常精子の出現率のピークは0.25Gyで1.5%, 0.50Gyで1.8%, 1Gyで5.4%, 2Gyで13.1%および3Gyで14.9%である。さらに、頭部異常精子の誘発率は0.25, 0.50Gyでは照射後12週目、1Gyでは16週目でそれぞれ照射前の

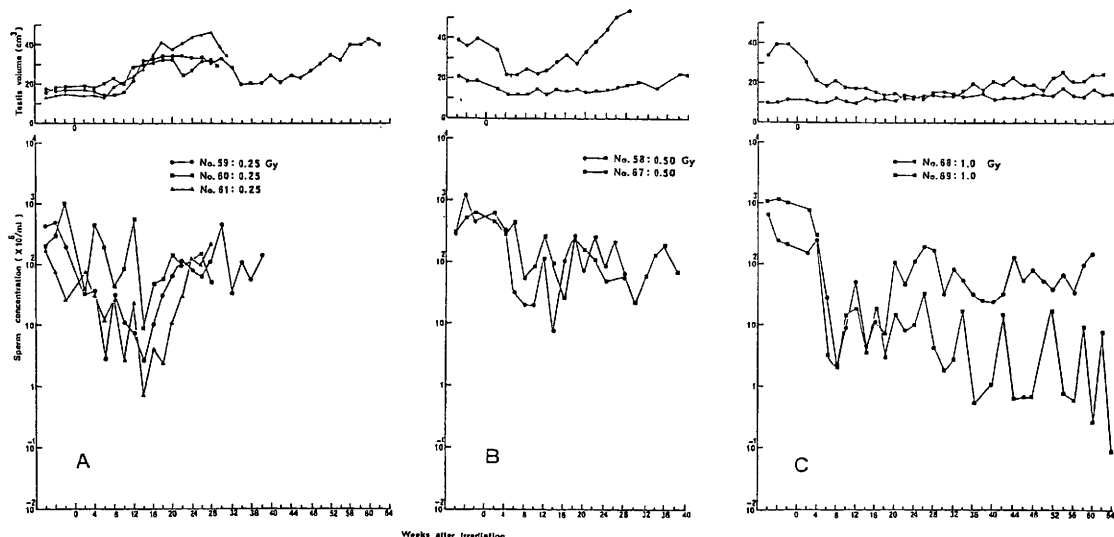


図5 X線照射によるカニクイザル精巣容積および精子濃度の変動、  
A: 0.25Gy 照射, B: 0.50Gy 照射, C: 1.0Gy 照射



図6 カニクイザル精子の精子頭部形態異常の型

レベルに回復したが2, 3Gyではその時点で回復は認められていない。なお、Bruceら(1974)によるとマウスでの感受性は照射後5～6週間と報告されていることからカニクイザルおよびマウスにおける感受期の時間的な差は精子形成期間の差であると推察されるが、精子形態異常の放射線感受期は精子形成過程の精原細胞後期ないし精母細胞の減数分裂前期にあるものと推定される。

2) 線量効果: C3H, C57BL系マウスにX線を急照射して得られた精子頭部形態異常の線量効果はそのF<sub>1</sub>であるBC3F<sub>1</sub>系マウスに比較して著しく高い(図8)。特に注目すべきは線量効果関係は、自然の異常頻度の割合にほぼ比例することであり、これは遺伝リスク推定に用いる倍加線量の基本概念が精子頭部形態異常の誘発の場合にもあてはまることを示唆するものである。また、カニクイザルの線量効果はマウスよりも低く、むしろ、ハムスターに近い(図8)が、この結果は松田ら(1983)によって得られたカニクイザルの相互転座の誘発率がマウスよりも低いという報告とよく一致している。なお、カニクイザルにおける緩照射の結果を急照射の結果と比較すると約1/

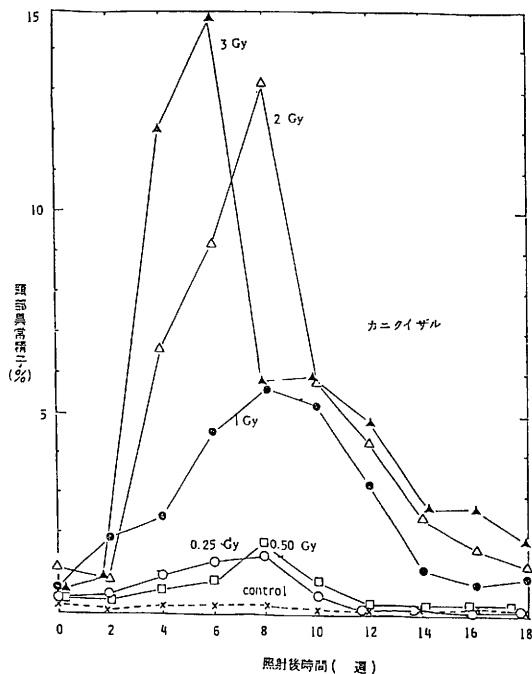


図7 放射線照射後における頭部形態異常精子の出現頻度

2の低線量効果が見られた。このように放射線により誘発される遺伝障害の指標として、精子形態異常のうち、特に頭部異常の有効性が明らかとなった。また、放射線により誘発される精子形態異常の原因として、精子形成における遺伝情報の発現過程での損傷、染色体異常、あるいは遺伝子

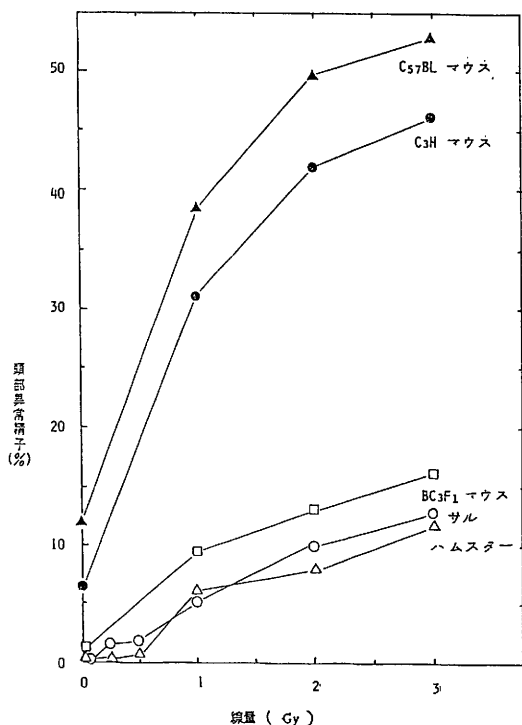


図8 放射線照射による精子頭部形態異常の線量効果

突然変異の三者が考えられるが、これらの発生機構についてさらに詳細な説明が必要である。

#### 4. 結 論

a. カニクイザルの実験動物学的検討を行い、放射線による遺伝障害検出のための実験動物のシステムを確立した。特に、直腸法による電気射精技術の検討を行い、簡便で有効な精液採取法および条件を確立し、精液の性状検査および、繁殖生理学的基礎データを集積した。さらに、精子濃度および精巣容積の年次的推移を測定した結果、精子濃度は  $10^7 \sim 10^9/\text{ml}$  の変動域にあること、両測定値より精子形成についての季節的変動は認められないことを明らかにした。

b. カニクイザルの精子濃度および精巣容積におよぼす $\gamma$ 線急・緩照射およびX線急照射後の影響について検討した結果、これらの測定値が放射線障害、回復の指標として簡便で有効であることを明らかにするとともに、回復までの期間を決定した。また、カニクイザルの精子形成過程において高感受性の細胞は、精原細胞であること、照射後の雄性生殖細胞に対する放射線の細胞致死作用は、カニクイザル>ハムスター>マウスの順であ

り、種差が大きいことが示唆された。本研究は、ヒトの放射線障害のリスク推定に必要なサルモデル実験系を確立し、ヒト事故被曝時の線量、障害の推定のために基礎資料を提供するものと思われる。

c. 放射線(X線、 $\gamma$ 線)を照射することにより精子形態異常について検討を行い、種差を解明するために系統の異なるC3H, C57BL, BC3F1系マウスおよびカニクイザルを用いて、精子形態異常の型、放射線感受期および線量効果を明らかにし、精子形態異常、特に頭部異常が放射線による遺伝障害の有力な指標となることも明らかにした。

#### 〔謝 辞〕

本研究課題の機会を与えられ、指導と援助をいただいた前遺伝研究部長中井斌博士(現木原研究所長)、指導と助言をいただいた国立予研筑波霊長類センター所長本庄重男博士、長文昭室長、東大医科教授豊田裕博士、実中研霊長類研究室長谷岡功邦博士および技術的協力をいただいた検疫室長山極順二博士、技術課、放射線安全課、動植物管理課の諸氏に対して感謝いたします。

#### 〔研究発表〕

- 1) 北爪、岡本、中井：トキシジェロジーフォーラム、6、214-223、1983.
- 2) 北爪、岡本、中井：第26回日本放射線影響学会、京都、1983.12.
- 3) 岡本、北爪：第18回日本実験動物学会、神戸、1983.12.
- 4) 岡本、北爪：第28回ブリマーテス研究会、犬山、1984.3.
- 5) 岡本、北爪：第27回日本放射線影響学会、千葉、1984.9.
- 6) 北爪、岡本：第27回日本放射線影響学会、千葉、1984.9.
- 7) 岡本、北爪、中井：第28回日本放射線影響学会、奈良、1985.10.
- 8) 岡本、北爪：第34回日本実験動物学会、岡山、1987.5.
- 9) 岡本、北爪、戸張：第30回日本放射線影響学会、東京、1987.12.
- 10) Kitazume, M., Okamoto, M. and Nakai, S.: *J. Radit. Res.*, **29**, 97-103, 1988.
- 11) 岡本、北爪：第35回日本実験動物学会、金沢、1988.5.

### Ⅲ 内部被曝影響評価に関する調査研究 概説

松 岡 理 (内部被ばく研究部)

#### General Activities of Radiotoxicology Research Group

Osamu Matsuoka  
Division of Comparative Radiotoxicology

Based on former research project of this group, new modern research facility for biomedical research on transuranium elements including inhalation study was constructed and starting operation by non-radioactive and beta and gamma emitting radionuclides. The various specific experimental facilities such as not only small animal inhalation facilities but also inhalation facilities for dog or monkey associated with animal maintaining glove box for inhaled animals. Waste disposal plants implanted underground of this building are successfully functioned to treat continuously huge amounts of contaminated biological exhaust water and animal carcass.

During this project period, five scientists of this group went to foreign laboratories and university of related research and spent one year or more to co-operate study as a visiting scientist. These international exchange of young scientists encouraged their work very much obtained information were very valuable for future works.

As to the research conducting under insufficient condition such as under construction of

various experimental facilities and limited use of plutonium, following six different programs of fundamental and preliminary for plutonium research were performed 1983-1988.

1) Movement and Metabolism of Radioactive Particles in the Respiratory Tract.

2) Studies on Dosimetry for Internally Deposited Alpha-Emitter.

3) Comparative Toxicological Studies on the Effect of Internal Exposures.

4) Studies on the Treatment of Alpha-Radioactive Waste.

5) Methodological Studies on the Inhalation of Radioactive Aerosols.

6) Removal of Transuranic Elements by DTPA

Above studies were mainly emphasized on the particulate properties of plutonium and various kinds of Pu-simulated particles were employed for experiment, however, the result obtained will be compared with plutonium particle in very near future. Forty open literatures obtained are summarized under separate cover as an Appendix.

#### 1. 今回の特別研究における “内部被曝影響”

グループの活動の概要は、51年から着工した内部被ばく実験棟の建設と、内部の実験施設の整備

およびその性能テストという研究環境の確立とである。また研究グループの体制の確立、そして一般ベータ、ガンマ放射体を用いたプルトニウム実験を模擬する各種実験、短寿命 RI による小動物吸入実験などの実施により本格研究への能力を高

めた。本実験期間には、原研、動燃の多大の援助により、高純度の酸化プルトニウムの実験棟への導入に成功し、昭和63年度に一部分入ったが、その化学形を硝酸塩に変換することに成功し、本格的動物実験への準備が完了した。

## 2. 特研期間における研究者の国際交流活動

今回の研究においては、とくに研究員の国際的関連研究機関での実地研修をかねた研究が本グループ研究員によって次々と行われ、国際レベルの研究能力を養ったことである。まず、小木曾洋一室長が昭和57年から58年まで米国ジョージタウン大学でアスベスト吸入障害の研究に招へい研究員として従事すると共に、今日の吸入障害研究の手法開発に有用な技能を獲得した。

58年に高橋千太郎が原子力留学生として英国MRC放射線研究所で、粒子状放射性物質の上部呼吸気道での挙動の研究に従事し、今後のプルトニウム研究に有力な情報と技術を習得した。つづいて昭和59年には石博信人が同じMRCではあるが、国体飛跡検出器(CR-39)による組織中のアルファ粒子の分布測定の見出し法の基礎的研究を行い、今日の研究の発展の基礎を築いた。61年には山田裕司が、世界の吸入実験技術のメッカとも言うべき米国ラベレス研究所へ原子力留学生として、吸入実験による実験研究に参加し、自己の設計製作した小型動物実験装置の性能について専門家と討議する機会を得、それが帰国後の中型動物吸入装置の設計製作に反映された。61年には松岡がフランスのアンジェで開かれた“放射性核種の年令差”のワークショップに招かれ、核種の代謝の年令差の分類、解析に関する論文を発表すると共に、パネリストとして年令差分析における動物種差分析の必要性について話題提供を行った。

昭和62年には福田俊が上海医科大学の招待で研究交流研究者派遣制度により、ビーグル犬の生産体制指導のため出張した。更にチェコスロバキアで開催されたキレート剤の薬理学に関する国際シンポジウムに参加し、研究の成果であるDTPAの毒性に関して発表を行った。

一方松岡は昭和60年から国際放射線防護委員会(ICRP)の専門委員会2の委員に任命され、60年に英国イーストボーン、61年ミュウヘン、62年イタリアコモ等の会議に参加し、放射性核種の代謝、影響、線量評価の諸点について我国の研究成果をもとに討議に加わった。

## 3. 施設の建設における研究グループの寄与

内部被曝実験棟の建設は核燃料規制法にもとづくため通常の建設とは全くこととなり、施設の建設に事前の安全審査を受けるための各種の科学的根拠を研究部側が分担したのみならず、設計工事方法の認可、許可申請のための当局の事前協議など研究グループがこのためにさいた努力、労力は多大なものであり、グループの各人はそれぞれこれらの建設関連の業務を果たした。

## 4. 研究の概要

第1の粒子状物質の挙動代謝に関する研究グループは超ウラン元素研究において従来不明の点の多い粒子状物質の挙動を各種の粒子状物質を用いて1)呼吸気道支配リンパ系との関連、2)上部気道への粒子の長期的な沈着の有無、3)実験的に作製した病的条件下での吸入粒子沈着率とクリアランスの三つの方向から検討を加え、その成果は5つの論文として発表され、その一つはICRP出版物にも引用されている。病的状態下の吸収粒子の挙動はほとんど今までにデータがない分野なのでICRPの呼吸気道モデルのタスクグループにも提出された。

第2のアルファ線の内部被曝線量の測定と算定に関する研究のグループは、体内摂取放射能の初期沈着量の評価に始まり、最終的には体内でのミクロの線量分布に至るまでの物理的プロセスを追求する立場から、次の三つの点について検討を加えた。1)モンテカルロ法による肺モニタリング肺モニタ較正法の検討、2)小動物用Pu体外計測装置の開発、3)固体飛跡検出器による $\alpha$ オートラジオグラフィの開発である。1)についてはPu肺負荷測定の精度が現在なお極めて低いことからこの改善のため個人数学的ファントムをモンテカルロ法を用いて構築する方法を試みた。更にX線CT、NMRCT画像をファントム構築に利用する方法を検討し、その成果を三つの論文として発表した。2)に関しては、17KeVのX線による外部計測のため2インチ径のNaI(Tl)1mmの薄型検出器2枚を用い、5cmの厚さの鉛シールドを用いた小動物用全身計測装置を作製し、17KeVのLX線に対して23%という良好な分解能と最小限界検出放射能は37Bq(1nCi)と推定された。今後各種の動物実験に実用的に用いられ効果をあげることが期待できる。3)については、

新しいタイプの固体飛跡検出器 CR-39 をその高感度と定量性にすぐれていることから、 $\alpha$ 放射体の生体内の分布と定量に用いるためマクロおよびマイクロオートラジオグラフィへの適用をめざしている。その特性に関し、基礎的検討を行ったもので、特にマイクロオートラジオグラフィにおいては、染色標本と固体飛跡の重ね合せの技術の検討も行い、解像力、感度、定量性等にすぐれた性能を有することをあきらかにした。これらの成果は7つの論文に発表された。第3の内部被ばくの影響に関する比較動物学的研究に関しては、超ウラン元素による内部被曝にあたって重要標的臓器である肺および骨に重点において生理学的、病理学的立場からその機能障害の発現のメカニズムを *in vivo*, *in vitro* の両面から検討した。肺についてはとくに肺泡マクロファージの粒子とりこみによる免疫学的応答を中心に検討を加えた。各種の毒性、非毒性の粒子の吸入後の肺洗條により採取した場合や、*in vitro* で粒子をとりこませた場合などの比較などによって肺障害発現の機序に関して興味ある知見を得た。これらの成果はりの論文に発表されている。

骨については骨代謝ならびに体内から超ウラン元素を排除するために用いられる DTPA の毒性について検討を加え、従来ほとんど注目されていなかった毛細血管透過性の変化、心機能変化などの各種の副作用の発現をラットおよびイヌについて比較検討し、DTPA 治療にあたって配慮すべき問題点をあきらかにした。これらの成果は4つの論文として発表されている。

第4のアルファ廃棄物の処理技術に関する研究は、実験動物を用いる超ウラン元素の安全性研究における各種の放射性廃棄物の統一処理の基本方針を定め、設備の設計、建設を進めさらに実験施設としての安全性を評価することにある。本研究の期間中に施設は完成し、試運転調整をへて、コールドラン、RI ホットランを経てその安全性が確

証されたが、その過程において排気フィルタの性能に関して基礎的なデータの必要性を生じ、排気フィルタの性能評価の方法論の確立、現場試験法の改善をへて、最大透過粒子径の決定などの實際上非常に有益な実験結果をあげた。これらは海外の学会で発表され、高く評価された。

第5の放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研究では、プルトニウム動物実験の最も重要な投与方法である。吸入投与方法の技術を安全性と共に確立することはきわめて困難である。しかも吸入中の動物の呼吸量も同時に多数頭の呼吸機能の同時記録など新しい機能も要求される。この研究ではプルトニウムエアゾルの吸入をめざした小動物の吸入実験装置を設計し、非汚染粒子の吸入実験からはじめて短寿命アイソトープ  $^{198}\text{Au}$  粒子等のラットへの吸入実験に成功し、生物研究グループの研究の進展に多大の功献をした。更に62年度にはそれまでの経験をもとに中型動物吸入実験装置を完成させ、試運転調整を行っている。これらの吸入実験装置の設計製作は我国独自の技術で完成し、世界のトップレベルを達成したものとして意義がある。現在各部の性能が実験的に採取され、解析されている。これらの研究は粒子径との関係で整理され、将来の単分散エアロゾル実験へ向けての予備的検討となっている。

第6の超ウラン元素の生体除染に関する研究については、本研究において、特に体外から追出しが困難な肺に吸入されたプルトニウムの追出しに着目しての研究を中心に実施した。また前期に引きつづいて不溶性 DAPA の体内での微量可溶化を目的とした皮下埋込みによる血液濃度維持の研究も実施した。実験には主として  $^{59}\text{Fe}$  の水酸化コロイドをシュミレータとしてラット肺マクロファージを中心に研究を行い、肺マクロファージ活性化物質との併用も *in vitro* の実験でもこころみられ興味ある知見を得た。これらの結果は三つの論文として発表された。

# 1. 粒子状物質の生体内挙動、代謝に関する研究

高橋 千太郎, 久保田 善久, 松岡 理 (内部被ばく研究部)

## Movement and Metabolism of Radioactive Particles in the Respiratory Tract

Sentaro Takahashi, Yoshihisa Kubota and Osamu Matsuoka  
Division of Comparative Radiotoxicology

In order to obtain some fundamental knowledge about the movement of radioactive particles in the respiratory tract, the following three series of experiments were carried out.

(1) The lymphatic drainage of particulate materials deposited in the respiratory tract was determined in Fisher 344 rat by using colloidal carbon,  $^{133}\text{BaSO}_4$  and  $^{198}\text{Au}$ -colloid as tracer materials. While the lung region may be drained mainly to the posterior mediastinal lymph nodes, the tracheal wall drains primarily to the internal jugular and posterior cervical nodes.

(2) Long-term retention of intracheally administered  $\text{BaSO}_4$  particles in the rat trachea was determined up to 6 months after injection. The amount of  $^{133}\text{Ba}$  retained 1 week

after injection in the caudal region of the trachea was 0.41% of the initial dose.

Thereafter the  $^{133}\text{Ba}$  was cleared exponentially with a mean half-time of 88 days.

(3) The deposition and clearance of inhaled or instilled  $^{198}\text{Au}$ -colloid were studied in rats with pulmonary lesions induced by delayed type hypersensitivity (DTH) reactions. The initial deposition of inhaled  $^{198}\text{Au}$ -particles was significantly decreased in the lung lobes with DTH lesions. Early mucociliary clearance of  $^{198}\text{Au}$ -particles was also impaired in the lung with DTH. These results suggest that the deposition pattern and the subsequent movements of inhaled particles in the respiratory tract might be considerably influenced by pathologic conditions in the lung.

### 1. 緒言

放射性物質の生体内摂取に起因する内部被曝の影響を評価する上で、対象とする放射性物質の生体内における挙動、代謝に関する知見が必要である。過去、種々の放射性核種を対象として、その生体内挙動、代謝に関する研究が行われてきたが、それらの研究はイオン状の放射性核種を対象としたものが多く、生体内において粒子もしくはコロイドの状態で存在する、いわゆる粒子状放射性物質の生体内挙動、代謝に関しては不明な点が多い。放射線防護の観点から関心のもたれているプルトニウムなどの超ウラン元素も、しばしば粒子状で

生体内に吸入摂取され、あるいは、イオン状で生体内へ摂取されても生体内ですみやかに水酸化物重合体を形成し、コロイド状で挙動することが知られている。本研究では、このような代表的な粒子状放射性物質の一つである粒子状超ウラン元素の生体内挙動に関する基礎的な知見を得ることを目的とし、超ウラン元素の生体内侵入経路としてもっとも重要な呼吸器における粒子状物質の挙動に関して現在ほとんどデータの得られていない以下の3点について研究を行った。すなわち、1) 吸入された粒子が呼吸気道からクリアランスされる経路の1つである、粒子のリンパ系移行と粒子径の関係、および、げっ歯類における呼吸気道の支

配リンパ節の検索、2) 上部気道への粒子の長期的な沈着の有無とその機序、3) 遅延型過敏症によって肺炎を誘発したげっ歯類の呼吸器における吸入粒子の沈着率とクリアランス、の3点である。なお、本研究の一部は、高橋が原子力留学生として英国 MRC Radiobiology Unit に滞在中に行われた。

## 2. 研究方法

ラット呼吸器の支配リンパ節の検索：当研究所において生産された Wistar 系ラットおよび英国 MRC Radiobiology Unit にて生産された Fisher 344 ラットを用いた。

動物にハロセン麻酔下で、pontamin sky blue (BHD Diagnostic Division, UK) 又はコロイドカーボン (ART 5912, Rotring, UK) を、腹腔内、気管壁内および経気道的に投与し、投与後実体顕微鏡下で胸部のリンパ節の位置を検索した。また、各リンパ節を採取し、常法にしたがいパラフィン切片を作成し、投与経路と粒子沈着リンパ節の関係を調べた。

呼吸器沈着粒子の領域リンパ節移行量：供試動物は当所生産 Wistar 系ラットである。トレーサー粒子としては、 $^{133}\text{BaSO}_4$  粒子 (平均  $0.34\mu\text{m}$ )、 $^{198}\text{Au}$  コロイド粒子 ( $0.01\mu\text{m}$ ) および  $^{59}\text{Fe}$  水酸化鉄コロイド粒子 ( $0.005\mu\text{m}$ ) を用いた。ラットはハロセン麻酔下で気管を露出し、ナイロンカニューレ (PE50) を気管第1分岐部付近に留置した。動物が麻酔より覚醒後、 $0.05\sim 0.1\text{ml}$  の粒子懸濁液を動物の吸気に合わせて注入した。動物は一定期間飼育後、放血と殺し、胸部のリンパ節を摘出し放射エネルギーをオートウェル型  $\gamma$ -カウンター (Beckman D5500) で測定した。

上部気道への粒子の沈着：供試動物は、英国 MRC Radiobiology Unit にて生産された Fisher-344 系ラットである。トレーサー粒子としては  $^{133}\text{BaSO}_4$  粒子を用い、上記の微細カニューレ法で  $10\mu\text{l}$  を気管腔に静かに投与した。投与後1～24週までの間、経時的にと殺し、気管、肺葉外気管支、肺、領域リンパ節を取り出し、オートウェル型  $\gamma$ -カウンターで  $^{133}\text{Ba}$  の移行、沈着量を調べた。また、24週目にと殺した5匹の動物については、NaI 検出器に鉛製の5mm幅のスリットをつけた全身計測装置を用い経時的に全身をスキャンし、上部気道へ沈着した  $^{133}\text{Ba}$  量を外部計測法によって測定した。なお、本研究は、高橋が英国 MRC Radiobiology Unit にて行

った。

肺に遅延型過敏症を誘発したラットの吸入実験：当所で生産した Wistar 系ラットをあらかじめメチル化牛血清アルブミン (BSA) の皮下投与によって免疫した。次にメチル化 BSA をカップリングした Sepharose-4B (Pharmacia, Japan) のゲル粒子を経気道的に肺内へ投与した。なお、一部のラットでは、特定の肺葉にのみ投与した。投与後2日目に  $^{198}\text{Au}$  コロイド粒子を鼻部より吸入投与、もしくは気管内カニューレシヨで投与した。吸入投与には、本特研の吸入実験グループが開発した小動物用吸入実験装置を用いた。吸入粒子は安定化剤として加えたゼラチン・グルコース粒子に  $^{199}\text{Au}$  コロイドが内包されたものでその粒子径は約  $0.3\sim 2\mu\text{m}$  (CMD) である。動物は  $^{198}\text{Au}$  コロイドの投与後2～3日目にと殺し、全身各部位への  $^{198}\text{Au}$  の移行量をオートウェル型  $\gamma$ -カウンターを用いて求めた。また、一部のラットについては全身計測装置を用いてスキャンし、全身および胸部での  $^{198}\text{Au}$  の存在量を外部計測によって決定した。

## 3. 結果

図1および2に、Fisher-344 ラットの頸部

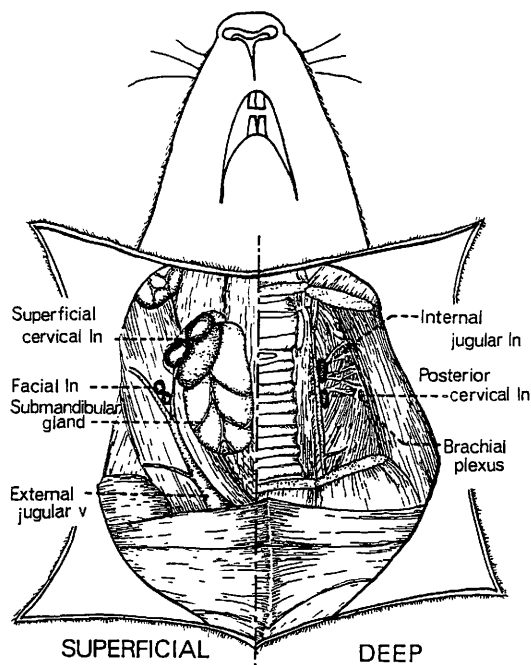


図1 Fisher 344ラットの頸部に認められたリンパ節

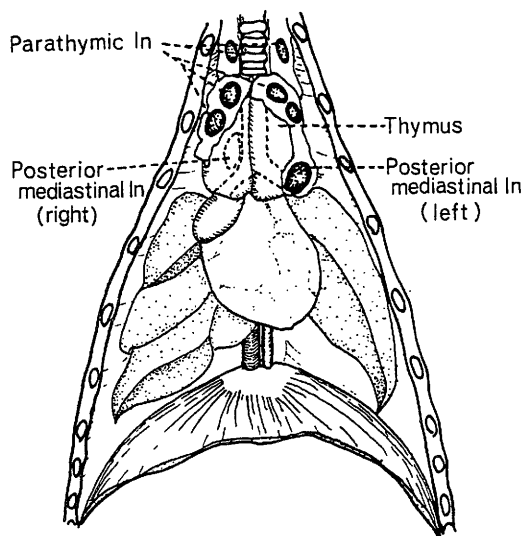


図2 Fisher 344ラットの胸腔内に認められたリンパ節

および胸腔内に認められたリンパ節の位置を示した。Wistar 系ラットにおけるリンパ節の位置や数は、傍胸線 (parathymic) リンパ節の数に差が認められるだけで、Fisher 系ラットとほぼ同様であった。投与経路と移行・沈着リンパ節との関連を表1に示した。トレーサー粒子であるコロイドカーボンを腹腔内に投与したとき、胸部の傍胸腺リンパ節への移行が認められ、一方、経気道的に肺内へ投与したときは、後縦隔 (posterior-mediastinal) リンパ節への移行が顕著であった。また、気管壁へ直接投与した場合、深頸部のリンパ節への移行が認められた。次に粒子径の異なる  $^{133}\text{BaSO}_4$  粒子 ( $0.34\mu\text{m}$ ) と  $^{198}\text{Au}$  コロイド粒子 ( $0.01\mu\text{m}$ ) を経気道的に投与したラ

表1 頸部および胸部のリンパ節におけるコロイドカーボンの沈着状態

Time after injection	1 week			2-3 months		
Route of injection <sup>a</sup>	IP	LI	TI	IP	LI	TI
Lymph node						
superficial cervical	-	-	-	-	-	-
facial	-	-	-	-	-	-
internal jugular	-	+-	+-	-	+-	+
posterior cervical	-	+-	-	-	+-	+
parathymic	++	+-	-	++	+-	-
posterior mediastinal						
right	-	++	-	-	+	+-
left	+	++	-	+	++	+-

沈着の程度：-、negative；+ -、slight；+、moderate；++、heavy.

a 1 p、腹腔内投与；L 1、経気管支肺内投与；T 1、気管壁への直接注入

ットにおける、両粒子の領域リンパ節への移行量を表2に示す。粒子径に大きな差があるにもかかわらず、両粒子の領域リンパ節の移行量は、後縦隔リンパ節を例にとるとともに投与量の0.02～0.04%範囲にあり、粒子径の影響は認められなかった。

上部気道への粒子の長期的滞留を明らかにする目的で、気管腔に  $^{133}\text{BaSO}_4$  粒子を投与したラットの、投与後1～24週における各部位への  $^{133}\text{Ba}$  の沈着・移行量を表3に示した。粒子を投与した気管の遠位部には投与後1週間においても、投与量の0.41%が沈着し、24週を経ても依然0.1%の滞留が認められた。図3に示したように、この部位への滞留率は投与後の時間の経過とともに低下し、その消失速度の半減期は最小二乗法近似により88日と計算された。カニューレの挿入のために切開を行った上部気管支には、投与後1週間目

表2 気管内挿管で肺へ投与された  $^{133}\text{BaSO}_4$  および  $^{198}\text{Au}$  コロイド粒子の領域リンパ節への移行<sup>1)</sup>

Experiment	Tracer	Lymph nodes <sup>2)</sup>			
		superficial	deep cervical	parathymic	mediastinal
EXP I	$^{198}\text{Au}$	$0.007 \pm 0.006$	$0.004 \pm 0.001$	$0.007 \pm 0.006$	$0.039 \pm 0.019$
	$^{133}\text{Ba}$	$0.009 \pm 0.005$	$0.008 \pm 0.005$	$0.007 \pm 0.007$	$0.036 \pm 0.022$
EXP II	$^{198}\text{Au}$	$0.009 \pm 0.006$	$0.003 \pm 0.001$	$0.009 \pm 0.006$	$0.031 \pm 0.009$
	$^{133}\text{Ba}$	$0.001 \pm 0.002$	$0.002 \pm 0.002$	$0.004 \pm 0.005$	$0.022 \pm 0.008$

1) 移行量は投与後2日目における全身滞留量に対する百分率で示した。

表3 気管腔に投与された $^{133}\text{BaSO}_4$ 粒子の各部位へに移行・沈着量  
移行・沈着量は、投与量に対する百分率で示した。

	Time after injection (weeks)				
	1	4	8	16	24
No. of rats	5	6	5	5	5
Trachea					
Caudal	0.41 $\pm$ 0.13	0.30 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.03
Cranial	4.0 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 1.3	1.2 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.8	0.57 $\pm$ 0.34
Larynx <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.06	0.070 $\pm$ 0.034	0.027 $\pm$ 0.045	0.097 $\pm$ 0.067	0.012 $\pm$ 0.008
Bronchi <sup>b</sup>	0.013 $\pm$ 0.022	0.004 $\pm$ 0.002	0.001 $\pm$ 0.002	0.003 $\pm$ 0.002	0.001 $\pm$ 0.001
Lung lobes	1.1 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.6	0.48 $\pm$ 0.55	0.10 $\pm$ 0.16	0.006 $\pm$ 0.008
Lymph nodes <sup>c</sup>	0.034 $\pm$ 0.012	0.056 $\pm$ 0.022	0.032 $\pm$ 0.026	0.020 $\pm$ 0.022	0.013 $\pm$ 0.009
Rest of carcass	0.84 $\pm$ 0.08	1.3 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.6
Total	6.52	5.53	3.17	3.07	1.80

a 咽頭の一部を含む喉頭部

b 気管第1分岐部を含む肺葉外気管支

c 頸・胸部のリンパ節

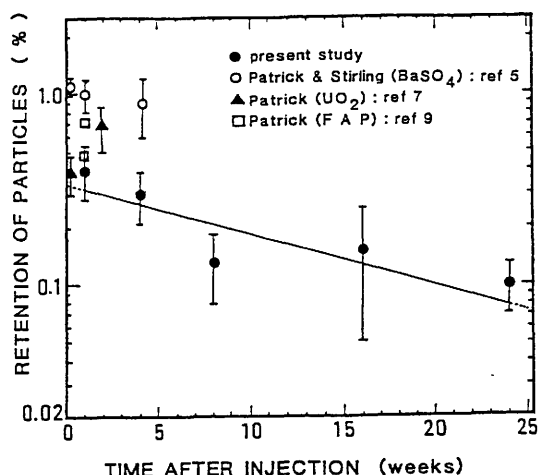


図3 ラットの気管における $^{133}\text{BaSO}_4$ 粒子の滞留率たて軸は投与量に対する割合

約4%の沈着が認められたが、これはカニューレの挿入、摘出時の汚染によるものと推測された。投与後24週まで飼育した5匹のラットにおいて、経時的に気管部に残留する $^{133}\text{Ba}$ 量を外部計測によって測定した結果を表4に示した。投与後1週間目における計数値を100%とすると、投与後24週で遠位気管部では30%に、近位気管部では12%となり、その半減期は、それぞれ95および52日で

あった。この半減期の値と、表3に示した経時的なと殺、解剖によって求めた値との間に有意な差は認められなかった。気管部以外にも、表2に示したように、咽頭部、肺外気管支部、肺葉部および領域リンパ節に有意な沈着を認めた。

表5に、特定の1肺葉にのみDTHによる肺炎を誘発したラットに、 $^{198}\text{Au}$ -コロイドエアロゾルを吸入させた場合の初期沈着の状態を示した。対照群のラットでは左葉に全肺沈着量の約30%が沈着していたのに対し、この左葉にのみDTHを誘発したラットでは全肺沈着量の8.6%が沈着したにすぎなかった。表4の下の部分に示したように、DTHを誘発していないコントロール群のラットの各肺葉への沈着率（全肺沈着率に対する百分率）を100%とし、DTHラットのDTHが誘発された肺葉での沈着率の平均を求めると、約55%と低下しており、DTH誘発肺葉へは吸入粒子が沈着しにくくなることが示唆された。次に、呼吸気道に沈着した粒子の初期クリアランスがDTHによる肺炎によってどの様に影響を受けるかという点について検討するため、 $^{198}\text{Au}$ -コロイドを気管内挿管で投与し、投与後2～3日後における胸部および全身または腹部での $^{198}\text{Au}$ の放射エネルギーを外部計測法で求めた（図4）。投与後3日目における胸部と腹部の放射エネルギーの比は、DTH誘発ラットで有意に高かった。

表 4 外部計測法によって求めた  $^{133}\text{BaSO}_4$  粒子の気管への滞留<sup>1)</sup>

1) 滞留率は、投与後一週間目の存在量を100%とした相対値。

	<i>Time after injection (weeks)</i>					
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>8</i>	<i>16</i>	<i>24</i>
Trachea						
Caudal	100	85 ± 37	73 ± 24	40 ± 16	35 ± 17	30 ± 16
Cranial	100	90 ± 12	91 ± 12	56 ± 8	26 ± 8	12 ± 6

表 5 各肺葉における  $^{199}\text{Au}$ -コロイド沈着量の比

lung lobe	control rats	DTH rats	
		Example 1)	Example 2)
Left	30.9 + 4.6 %	8.6%*	45.4%
Right apical	11.7 + 1.9	8.5	12.1
Right cardiac	12.5 + 1.0	22.7	10.8
Right diaphragmatic	27.6 + 2.9	37.5	16.2*
Right intermediate	14.2 + 2.7	22.0	14.2
Tracheo-bronchi	3.1 + 1.4	0.7	1.3

Example 1)

Left lobe of control rats; 30.9% → 100.0%

Left lobe of Example 1) of DTH rat; 8.6% → 27.8%

Example 2)

Right diaphragmatic lobe of control rats; 27.6% → 100.0%

Right diaphragmatic lobe  
of Example 2) of DTH rat ; 16.2% → 58.7%

Control rats	Beads injected rats	DTH rats
100.0 %	103.8 + 9.7 %	54.7 + 21.8 %

また、投与後3日目の全身に残存する放射エネルギーに対する胸部の放射エネルギーの比も、DTHで有意に高かった。このことから、一旦、粒子が呼吸気道に沈着してしまうと、DTHによる肺炎を誘発

したラットでは上部気道を介する上行性の初期クリアランスが阻害されていることが示唆された。

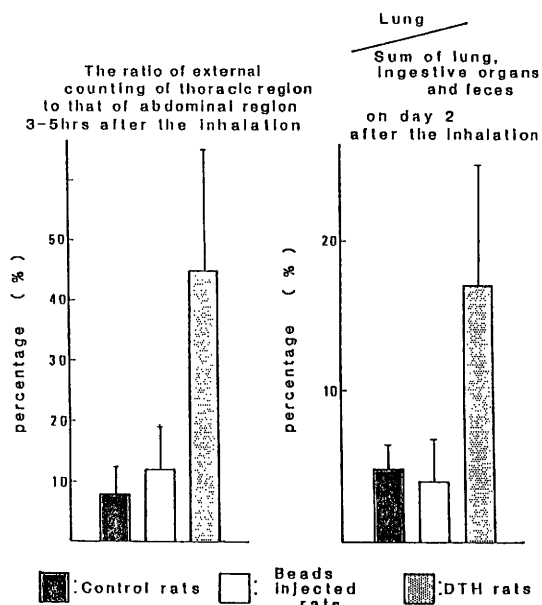


図4 呼吸器に沈着した $^{198}\text{Au}$ コロイドの初期クリアランスに及ぼすDTHの影響

#### 4. 討 論

吸入毒性試験にラットが多用されているにもかかわらず、ラットの頸胸部に存在するリンパ節の解剖学的な記述は少なく、過去の成書、論文に示されたデータも一致しない点が多い。我々がFisher-344ラットで観察した頸胸部リンパ節の位置や数、大きさは、同じFisher系ラットにおいて過去に報告されたものと一致するが、系統の異なるラットでの報告と異なる点が多いことから、過去の論文において頸胸部リンパ節の位置や数に不一致がみられる原因の一つは、対象とするラットの系統差によるものではないかと考えられる。

図1、2に示したように頸胸部には、いくつかのリンパ節が認められるが、表1のコロイドカーボンの沈着パターンが示すように、たとえば、傍胸腺リンパ節は胸腔内に位置しながら、主として腹腔内からのリンパの流入を受けるリンパ節であって、呼吸器系の支配リンパ節ではない。したがって、吸入粒子のリンパ節への移行、沈着率を単位組織重量あたりで評価するとき、これらのリンパ節も試料中に加えると、放射能濃度が過小に評価されてしまうことになる。一方、頸部の深部にあるリンパ節は従来、吸入粒子のリンパ節移行を評価する際、特に注意が払われていなかったが、表1に示すように気管壁に投与されたコロイド

カーボン粒子がこのリンパ節に移行することから少なくとも上部気道からのリンパ系クリアランスに関与しているものと考えられる。したがって、吸入粒子のリンパ系クリアランスに関する実験では、上部気道に沈着した粒子がこの経路でクリアランスされる可能性のあることを考慮し、この部位のリンパ節についても採取、測定等の評価を行う必要のあることが示唆された。

従来、上部気道に沈着した粒子は、粘液纖毛運動によって急速にこの部位から消失するものと考えられてきた。国際放射線防護委員会(ICRP)の呼吸器モデルにおいても、気管・気管支部に沈着した粒子の1%は半減期0.01日で、99%は0.2日でこの部位から消失すると想定されている。しかし、表2に示したように、投与量の約0.4%は投与後一週間を経てもこの部位にとどまり、88日という長い半減期で消失した。この経時的な殺、解剖による結果は、スリットをつけたNaI検出器による外部計測法によっても確認された(表3)。本結果は、同様な実験手法を用いてラット呼吸気道に長期的な粒子の滞留が認められることを示した英国MRCグループの報告を裏付けるとともに、その半減期が50~100日であることを明らかにしたものである。この長期沈着の機序は、本研究からは明らかではないが、気管腔内のマクロファージ等貪食細胞が、気管上皮細胞を横断し遊走してくるものと考えられている。したがって、上部気道に沈着し、マクロファージによって貪食され、その遊走に従って上部気道壁へ移行した放射性粒子が、発ガン等における標的細胞の一つと考えられる上皮基底細胞を、長期にわたって照射する可能性があり、放射性粒子の上部気道への長期的滞留という問題は、放射線防護の点から重要である。

吸入された粒子の呼吸気道における挙動、代謝は粒子径や溶解性といった粒子側の要因だけでなく、解剖学的、呼吸生理学的な動物側の要因によっても変化することが推察されている。一般の公衆を対象として粒子状超ウラン元素の吸入による内部被ばくの影響を評価する場合、一般公衆が非常に生理学的に不均質な集団であることに留意しなければならない。我々は、呼吸器疾患のあるヒトにおける粒子状放射性物質の呼吸気道での代謝、挙動に関する基礎的な知見を得ることを目的として、呼吸器疾患を有するラットを用いて吸入実験を行った。ラットに実験的に誘発が可能な呼吸器疾患としては、マイコプラズマ肺炎、エラス

ターゼ投与による肺気腫、遅延型過敏症による肺炎等が考えられるが、一定の病変を、限局した部位に誘発させることができ、また、その病態が比較的よく検索されている等の理由からメチル化BSAをカップリングしたSephrose-4Bゲル粒子の経気道的投与によって遅延型過敏症を気道に誘発し、気道閉塞性の肺炎を誘発させたラットをモデル動物とすることにした。

表5に示したように、DTHを誘導した肺葉では、吸入された $^{198}\text{Au}$ -コロイドの沈着がコントロールに比べ有意に少なかった。Sephrose-4Bゲル粒子のみを投与し、DTHが誘発されていない肺葉における $^{198}\text{Au}$ -コロイドの沈着量はコントロールとの間に有意差が認められないことから、DTH誘発肺葉における吸入粒子沈着率の低下は、Sephrose-4Bゲル粒子によるものでなく、誘発されたDTH肺炎によることが明確である。この現象がもたらされる機序は不明であるが、DTH誘発肺葉の組織学的な検索では、炎症性細胞の浸潤による気道の閉塞が顕著であり、したがって気道の閉塞もしくは狭小に伴う気流の変化が、粒子沈着率を低下させているものと推察された。次に、気管内挿管法によって、 $^{198}\text{Au}$ -コロイドを強制的に気道内に投与し、その後の経気道クリアランス速度と全身各組織への分布について検討した。図5に示したように、肺への滞留を全身滞留量に対する比で表したところ、DTHラットでは有意に滞留率が高く、気道からの初期クリアランスがDTHによって阻害されていることが示された(図4)。吸入粒子の大部分は非常に速やかに肺マクロファージによって貪食されるので、DTHラットではこのような粒子貪食マクロファージが粘液纖毛運動によって上行性にクリアランスされる機構、もしくはマクロファージ自身の遊走に伴うクリアランスがDTHラットでは阻害されていることが示唆された。

詳細なメカニズムについては今後の検討を待たねばならないが、DTHラットにおける吸入性粒子の気道内挙動が、健康なものと異なっていることを本研究結果は明確に示した。本結果を直接ヒトへ適用することは不可能であるが、一般的に気道閉塞性肺炎が呼吸器に起こっている場合、吸入沈着量は低下するが、一方、一旦沈着した粒子はクリアランスされにくくなることが推察されよう。

## 5. 結 論

以上のように、本研究では吸入された粒子性超ウラン元素の呼吸気道内挙動、代謝に関する基礎的な知見を得ることを目的とし、過去に十分なデータの得られていないリンパ系クリアランス、上部気道沈着、肺炎動物での沈着、滞留に関する実験を中心に行ってきた。その結果、呼吸器に沈着した粒子は主として後縦隔リンパ節へクリアランスされ、その速度は粒子径の影響を受けないこと、上部気道へ沈着した粒子はその部位に長期に滞留すること、気道閉塞性の肺炎を有する動物では、初期沈着と共に初期クリアランスも障害されていること等が明らかにされた。呼吸器における粒子挙動に関わるパラメーターは非常に多く、複雑である。放射線防護の目的で使用できるように、これらのパラメーターを整理し、不足の点は実験的検討によって補足し、より精度の高い呼吸器代謝モデルを索定していくことが重要と思われる。

### 〔研究発表〕

- 1) Kubota, Y., Takahashi, S. and Matsuoka, O. : Dependence on particle size in the phagocytosis of latex particles by rabbit alveolar macrophages cultured in vitro. *J. of Toxicol. Sci.*, **8**, 189-195, 1983.
- 2) Kubota, Y., Yamada, Y., Takahashi, S. and Matsuoka, O. : Estimation of the amount of material inhaled by rats in the inhalation studies. *Exp. Anim.* **33** (4), 535-538, 1984.
- 3) Takahashi, S. and Patrick, G. : Patterns of lymphatic drainage to individual thoracic and cervical lymph nodes in the rat. *Laboratory Animals (London)*, **21**, 31-34, 1987.
- 4) Takahashi, S. and Patrick, G. : Long-term retention of  $^{133}\text{Ba}$  in the rat trachea following local administration as barium sulfate particles. *Rad. Res.*, **110**, 321-328, 1987.
- 5) Takahashi, S., Asaho, S., Kubota, Y., Sato, H. and Matsuoka, O. : Distribution of  $^{198}\text{Au}$  and  $^{133}\text{Ba}$  in thoracic and cervical lymph nodes of the rat following the intratracheal instillation of  $^{198}\text{Au}$ -colloid and  $^{133}\text{BaSO}_4$ . *J. Radiat. Res.*, **28**,

227—231, 1987.

- 6 ) Kubota, Y., Takahashi, S., Sato, H., Yamada, Y. and Matsuoka, O. : Pulmonary deposition and clearance of inhaled or in

stilled  $^{198}\text{Au}$ -colloid in the rat after the induction of pulmonary delayed type hypersensitivity reactions. *Hoken Butsuri*, **23**, 295—302, 1988.

## 2. アルファ放射体による内部被曝線量の 測定と算定に関する研究

石 樽 信 人, 関 口 昌 道, 仲 野 高 志, 松 岡 理  
(内部被ばく研究部)

### Studies on Dosimetry for Internally Deposited Alpha-Emitters

Nobuhito Ishigure, Masamichi Sekiguchi, Takashi Nakano and Osamu Matsuoka  
Division of Comparative Radiotoxicology

Dosimetry of internal exposure, in any cases, begins with the determination of the deposition and retention pattern of internally deposited radioactive elements. From a methodological point of view in this context, we have carried out the following three subjects.

(A) Calculation of Calibration Coefficient of Pu Lung Monitor Using Monte-Carlo Simulation

(B) Development of Pu In Vivo Counting Device for Small Experimental Animals.

(C) Development of Autoradiography of  $\alpha$ -Emitters Using Solid State Nuclear Track Detector ; (C-1) rapid and quantitative macroautoradiography of  $\alpha$ -emitters in a whole body section of an experimental animal, (C-2) simple microscopic autoradiography of  $\alpha$ -emitters in a histological section and (C-3) factors affecting etching properties of CR-39 solid state nuclear track detector for  $\alpha$ -particles.

The final goal of our dosimetric study is put

on re-assessing the dosimetric factors recommended by ICRP such as "the modifying factor" and "the quality factor". Since these quantities affect directly regulation on the intake of radioactive elements, the social as well as scientific significance of our work should not be small. The present study has been located as a step of methodological development in that course. We evaluate such a role of the present study to have been mostly fulfilled. Especially the techniques developed to assess macroscopically the initial deposition and retention in small experimental animals are expected to be used in various kind of aspects in the course of the research project as well as the dosimetric work. And the newly developed macroautoradiography using solid state nuclear track detector will serve us to obtain primary data for the work on microdosimetry in deep lung burdened with  $\alpha$ -emitters, which will be starting at April, 1988.

#### 〔はじめに〕

内部被曝の線量評価は、まず摂取放射能の初期沈着分布とその後の滞留パターンとを決定することから始まる。この観点から本課題では次の3つの小テーマを遂行した。

(A) モンテカルロ法による肺モニタ較正法の検討

(B) 小型動物用 Pu 体外計測装置の開発

(C) 固体飛跡検出器を撮像媒体とする $\alpha$ 放射体のオートラジオグラフィの開発

以下この順に成果の概要を報告する。

## (A) モンテカルロ法による肺モニタ較正法の検討

### 1. 緒言

プルトニウム（以下 Pu と略記する）取扱い施設では、Pu を含むエアロゾルを吸入被曝する潜在的危険性に備えて、肺モニタによる体外計測法の研究が進められている。肺モニタによって計測される放射線は、Pu がアルファ壊変する際に放出する低エネルギーの特性X線である。これは体組織による吸収減弱を受け易い放射線であるため、その計数効率、被験者の胸部の解剖学的個人差に左右され易い。理想的には、被験者と全く同じファントムを作成して個人別に計数効率を求めることが望ましい。本研究では、こうした方向を目指して、次のような新しい方法の開発に取り組んできた。即ち、磁気共鳴映像法等コンピュータ断層法によって被験者の胸部を連続的にスキャンし、得られた画像データから各個人の数学的ファントムを作成する。次にこの数学的ファントムとモンテカルロ法によって、肺内の Pu より発生した特性X線が体外へ放出される過程を模擬計算するという方法である。これによって、従来法ではあいまいさのあった各個人についての最適検出器配置やその時の計数効率、エネルギースペクトル等も直接計算可能となる。

### 2. 結果と討論

#### a. 散乱線の計数効率に及ぼす影響

個人別ファントムを用いたモンテカルロ計算に先立ち、従来考慮される機会の少なかった散乱線の厳密な取扱いについて検討した。その結果、干渉性散乱を無視してきた従来のモンテカルロ計算では、体外へ通り抜けるX線を数%過大に評価することになることが分かった。一方、非干渉性散乱においては、標的原子の電子の束縛を無視してきた従来の計算では、逆に体外放出光子を数%過小評価していたことが分かり、Pu 肺計測のような低エネルギーX線の輸送過程を扱うモンテカルロ計算では、これらの効果も組み込む必要のあることが示された。

#### b. 磁気共鳴映像法を用いた個人ファントムの作成

磁気共鳴映像データの利用に関しては、ボランティアの胸部を撮影し、この画像データを用いて臓器の描画能力の検討と臓器の輪郭線抽出の試みを行い、本手法の実現の可能性を検討した。

2種の角度からみた輪郭線の立体表示を図1に示す。肺や体輪郭については有望な結果が得られたが、肋骨の明確な描出が困難であり、精密なファントムを作成するためには、この点の改善が必要であった。磁気共鳴映像技術の進歩は著しく、今回のデータは、一装置のしかも性能改善の途上で得られたものである。今後の同期撮影等の導入によって改善されていくことが期待される。

また、X線 CT 画像データの利用に関しては、磁気共鳴映像法に比べ骨の描写能力がはるかにすぐれているので、被曝線量の観点から多用は困難

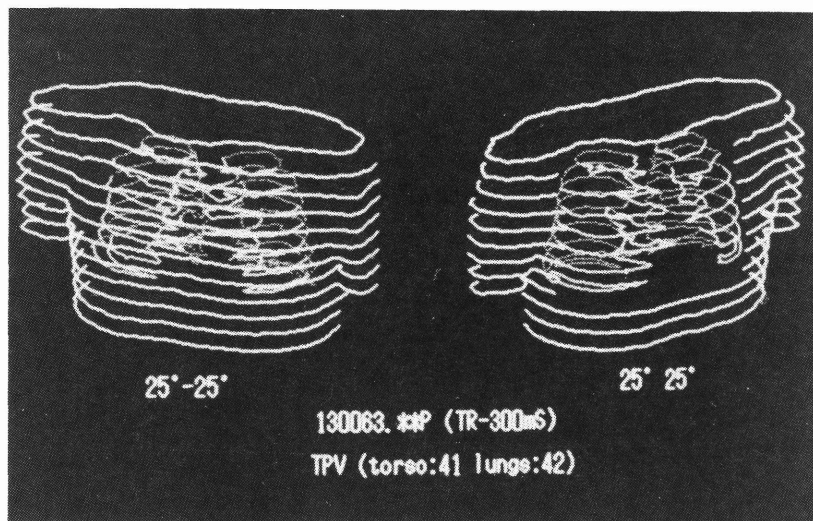


図1 磁気共鳴映像データより抽出した人体胸部の輪郭線の立体表示

であるが、少数のX線 CT と多数枚の磁気共鳴映像データとの組み合わせによる補完も将来の問題点として考えられる。

## (B) 小型動物用 Pu 体外計測装置の開発

### 1. 緒 言

実験動物の体内の Pu を、生存状態で体外より計測する技術はマクロなレベルではあるが、一匹の個体を連続的に追跡できる長所があり、線量評価のみならず代謝や影響、その他内部被ばくの全

ての研究課題で共通に使われる基盤となる技術である。これには放出率が低い上に動物の組織自身による自己吸収を受け易い低エネルギーの微弱なX線を検出する必要がある。このため低バックグラウンドでかつ高計数効率の特殊な計測システムを確立する必要があった。

### 2. 結果と討論

図2に本研究において設計・試作した小型動物用体外計測装置のブロック図及び断面図を示す。しゃへい箱の外寸法は129cm(W)×59cm(H)×

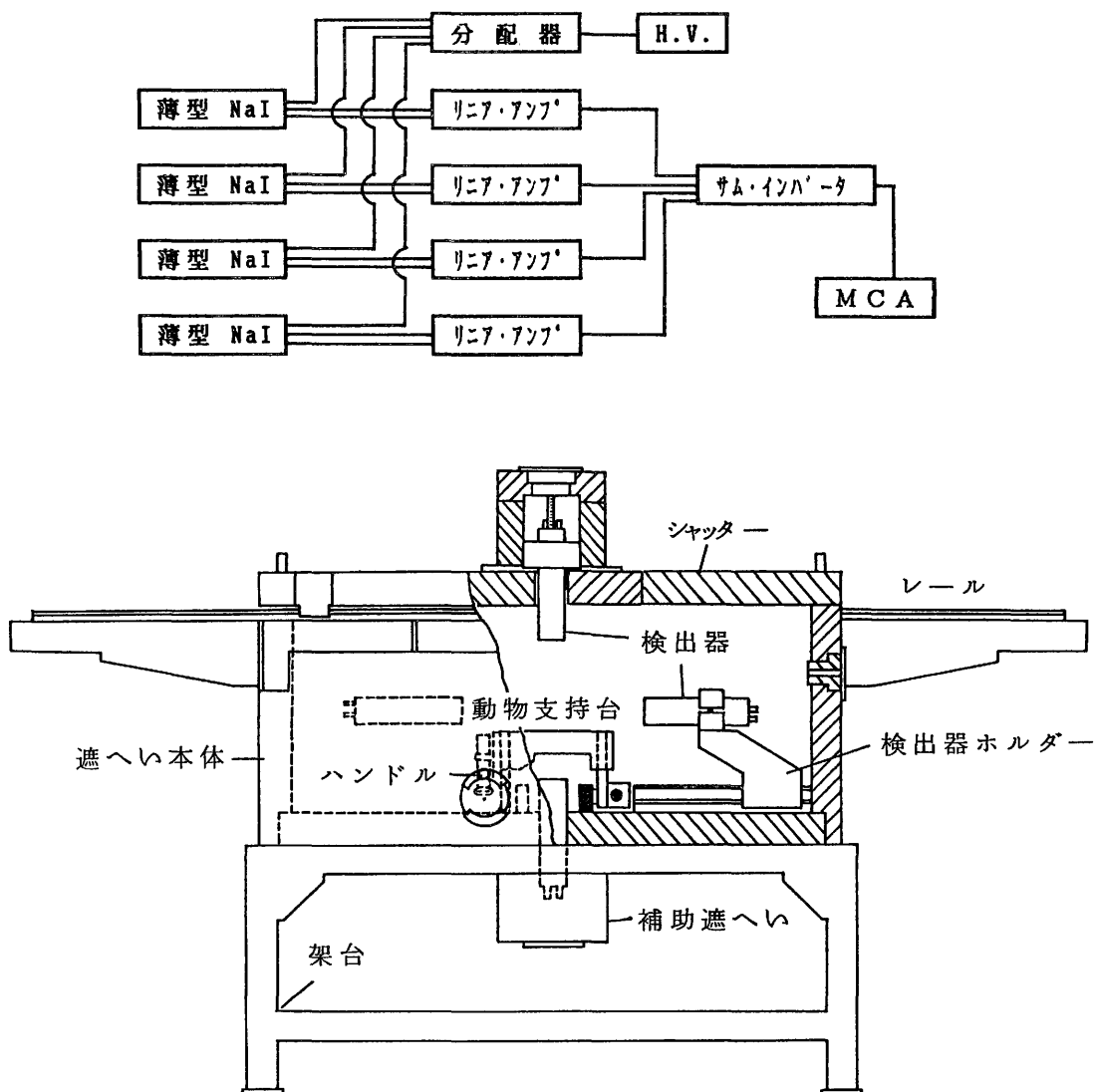


図2 小型動物用 Pu 体外計測装置のブロック図及び断面図

74cm (D) であり、内容積は約0.3 $\text{m}^3$ である。主たるしゃへい材として厚さ5cmの鉛を用い、その内壁には、バックグラウンドの低エネルギー成分を減衰させるため無酸素銅版とアクリル板とを各々5mmずつ内側に向かってこの順で内張りした。なお鉛材は日本分析センターでPb-210が有意に含まれていないことの確認がなされたものを使用している。検出器は直径2インチ、厚さ0.04インチ(1mm)の極薄型NaI(Tl)シンチレーションカウンタである。検出器の窓として厚さ0.001インチ(0.025mm)のAl薄膜を選択し測定対象の17keVのX線に対しては高い検出効率を得られ、妨害となるバックグラウンド放射線に対しては検出効率が低くなるようにした。この様な検出器を左右上下に各1本ずつ合計4本を配した。これらの検出器は全体がしゃへい箱の中に格納されているが色々なサイズの動物を想定し各検出器はそれぞれ左右上下に可動とした。各検出器のプリ・アンプ信号は加算される前に各々独立のリニア・アンプで増幅できるようにし、4信号のGain調整を容易にした。動物の支持台はしゃへい箱の外部よりハンドル操作にて前後及び上下方向にその位置を調節でき、これによって動物と検出器との幾何学的条件を精度よく設定できるようにし、同時に前後方向にスキミングすることによっておよその体内分布の測定もねらいとした。

図3に本装置により得られたAm-241の $\gamma$ 線、X線エネルギースペクトルを示す。17keVのX線に対するエネルギー分解能は23%であった。ま

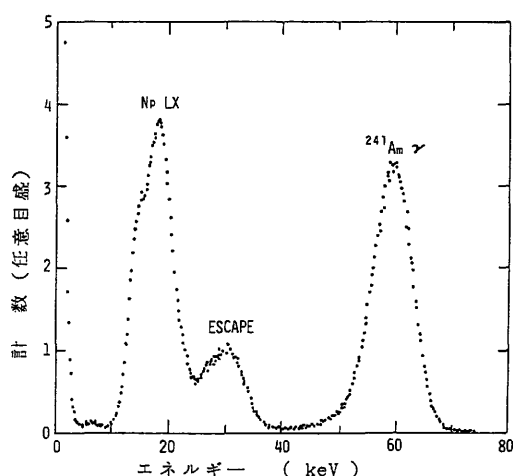


図3 小型動物用Pu体外計測装置で計測した $^{241}\text{Am}$ の $\gamma$ 線、X線エネルギースペクトル

たPu-LX線チャネルのバックグラウンド計数を測定したところ10cpmであり、予備的に検討した幾何学的効率と自己吸収の評価値から、最小検出放射能は37Bq(1nCi)と推定された。これは、内ばくプロジェクトで予定されている投与量に比べ充分低い値である。

## (C) 固体飛跡検出器を撮像媒体とする $\alpha$ 放射体のオートラジオグラフィの開発

### (C-1) マクロオートラジオグラフィ

#### 1. 緒言

オートラジオグラフィは、核燃料物質など $\alpha$ 放射体の体内沈着分布を研究する上で有用な手法である。しかし、写真乳剤を撮像媒体とする通常の方法では、乳剤の $\alpha$ 粒子に対する黒化効率が低い、ため、長期間露出しなければならない場合が多い。また、暗闇の中で $\alpha$ 放射能を取り扱わねばならないというのも不便である。

硬質プラスチックの一種、アリル・ジグリコール・カーボネート(商品名: CR-39, TS-16等)が固体飛跡検出器の素材として最近注目されている。筆者らは、このプラスチックが $\alpha$ 粒子に有感である点に加え、光学的透明度に優れている点、さらには、エッチピットの数というデジタル量が条件によっては計数できるという点に着目し、このプラスチックを撮像媒体とする迅速で簡便なオートラジオグラフィの開発を試みた。

このオートラジオグラフィの撮像原理は次の通りである。オートラジオグラフ用の切片と固体飛跡検出器とを所定の期間密着し、その後、強アルカリ溶液でエッチングすると $\alpha$ 粒子飛跡が拡大されエッチピットが生じる。このエッチピットは光の散乱中心となるので、巨視的に見ればプレート上のエッチピット密度の高い部分ほど白く見える。従って、CR-39プレートの下に光をよく吸収するものを置けば、切片の放射能分布が黒色を背景とする、エッチピット密度に対応した白い濃淡像として観察される。

#### 2. 結果と討論

##### a. 迅速性

古くから知られているように、プルトニウム(Pu)は骨と肝臓とに選択的に沈着する。 $^{239}\text{Pu}$ を1 $\mu\text{Ci}$ 静脈投与したマウスの凍結切片にCR-39を22分という短い期間露出した。得られ

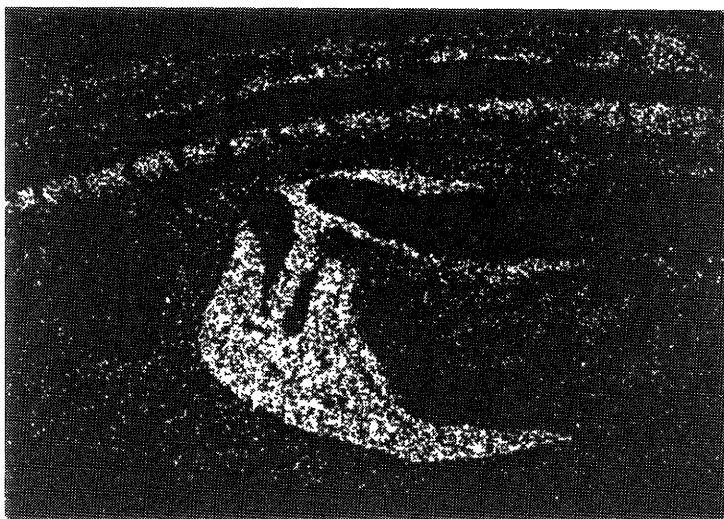


図4 22分間の露出により得られた、肝臓部位を中心とする CR-39 オートラジオグラフィの写真

たオートラジオグラフィの肝臓部位を図4に示す。Puの臓器による遍在性は、このように短時間の露出でも読み取ることができた。さらに長く露出すると、エッチビット密度が増し画像は一層鮮明となってゆき、12時間から24時間の露出で最良の画像が得られた。これ以上長く露出した場合には、画面が暗くなり鮮明度は逆に低下した。これは飛跡の密度が高くなり過ぎてエッチビットの重なり合いが生じ、エッチビットをお互いつぶし合う結果表面の凹凸がならされ、散乱光が弱くなることによるものと推察された。

図5(a)に24時間露出の場合を示す。比較のため、

通常法で作成した同一切片のオートラジオグラフィを図5(b)に示した。両者を比較すると CR-39の方が軟調であり荒れが若干大きいことが分かる。しかし、マクロオートラジオグラフィとして使用目的に合致する充分鮮明な画像が得られたと判断している。

#### b. 画質の評価

1) 特性曲線；図6は写真乳剤で言えば感度の特性曲線に相当するものである。縦軸にはフォトメータで測光した散乱光の、バックグラウンドに対する比の対数をとった。

階調度が一定の領域、即ち直線で近似し得る領

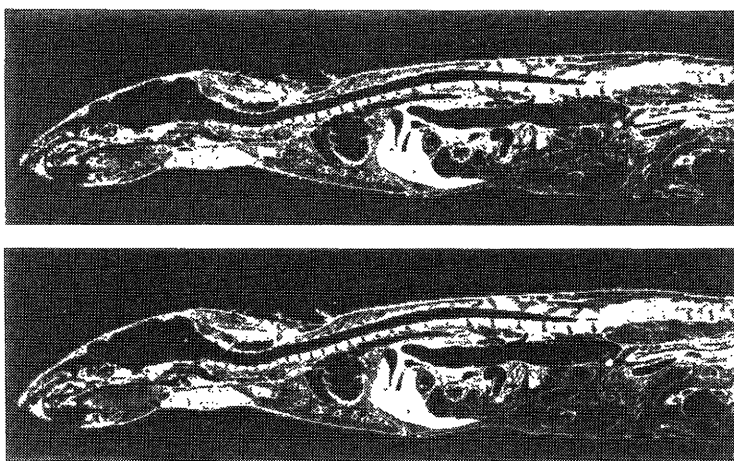


図5 (a) 24時間の露出により得られた CR-39 オートラジオグラフィ  
(b) 通常の方法による3週間露出のオートラジオグラフィ

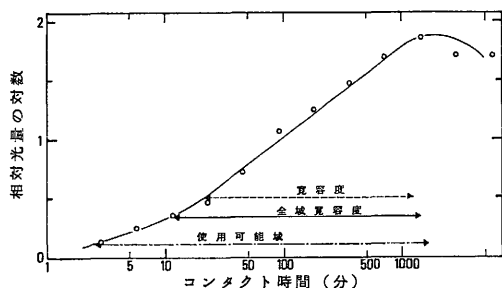


図6 CR-39 オートラジオグラフの感度の特性曲線

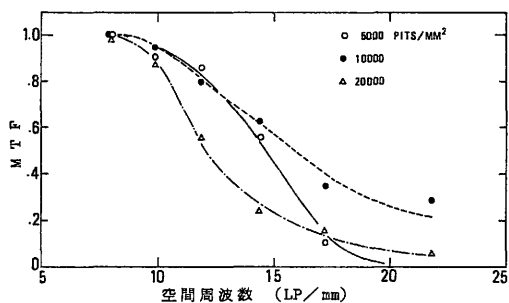


図7 CR-39 オートラジオグラフの MTF

域の傾きからガンマ値は0.8と評価され、軟調であるという肉眼観察での印象が裏付けられた。

直線部分の両端間の幅から寛容度は60、またガンマ値が0.8の1/2となる両端の幅、いわゆる全域寛容度と呼ばれる値は120であった。

2) 解像度；解像度の客観的な目安としてMTFを評価した。なおテストチャートには、矩形の溝が一定間隔で刻まれた金箔を用いた。図7に結果をテストチャートの空間周波数の関数としてプロットする。なお空間周波数とは、1mmの幅の中に刻むことのできるラインペアの数であり、たとえば、50 $\mu$ m幅の縞模様では1/(0.050 $\times$ 2)=10LP/mmとなる。

人間の眼は、0.1のコントラストを容易に識別できると言われている。そこで解像度の指標としてMTFが0.1となる空間周波数を内挿あるいは外挿によって求めることとした。その結果を図8に示す。同図には、目視により判定した解像度も示した。両法を比較したところ、エッチビット密度の高い5000、10000、20000/mm<sup>2</sup>の3点では、絶対値にやや差があるものの傾向は一致していた。しかし、密度の低い領域ではフォトメータによる評価値は目視に比べ極めて高い結果となった。

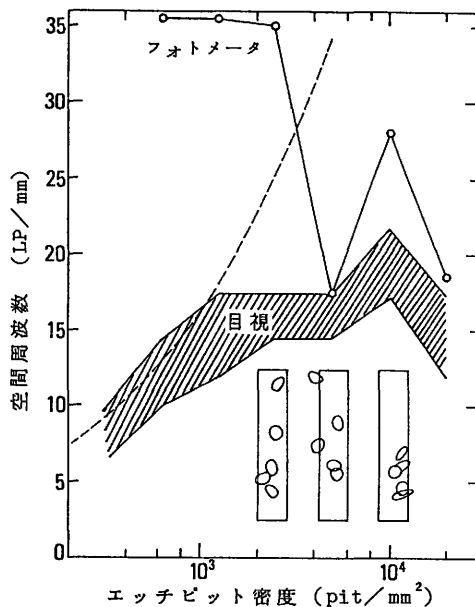


図8 解像度のエッチビット密度依存性

エッチビット密度が低い場合は、エッチビットが疎らになるので、目視では、溝と溝との間が適当に開いていなければ溝の縦方向への連続性、群化が生じない。このために解像度が低下したものと推察される。試みに、エッチビットの平均間隔が、溝と溝との間隔に丁度等しくなる空間周波数を計算したところ図8の破線のようになった。目視による判定と、低いエッチビット密度領域でよく重なった。一方、フォトメータは、溝に相当する部分にたとえ1個ずつでもビットが存在すれば、これを走査すると山と谷のあるカーブが得られるため、見掛け上、いかにも高い数値が得られてしまうものと推察された。このことからフォトメータの方法は低エッチビット密度領域の解像度の評価には適しておらず、主観が混じるとは言いながらも、目視による解像度の値の方が、むしろ妥当と考えている。

以上画像の観察及びその解像度等画質の評価から、通常の方法の1/20以下という短い露出時間にもかかわらず、使用に耐え得る鮮明な画像の得られることが分かった。迅速性以外にも、暗室操作が不要等の簡便さ、 $\beta$ ・ $\gamma$ 線に不感であることそして放射能濃度の定量の可能性も考えられ、中性子ラジオグラフィ等トラックエッチイメージング技術として、他分野への応用も期待される。

## (C-2) ミクロオートラジオグラフィ

### 1. 緒 言

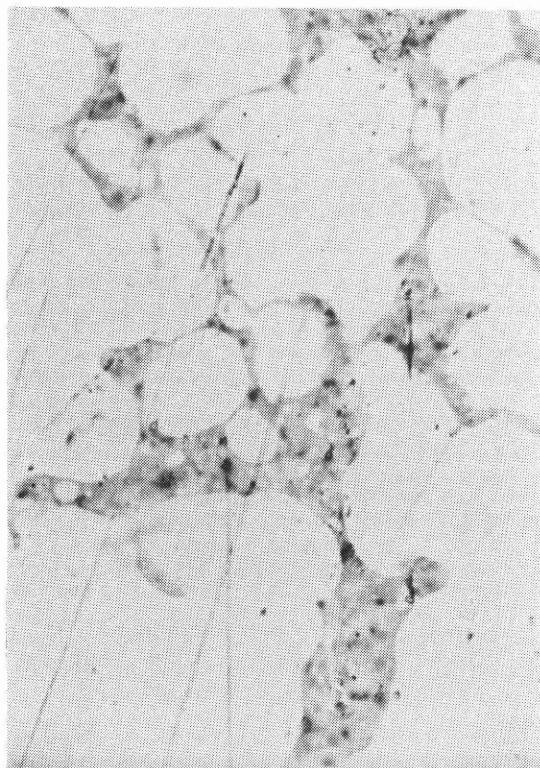
組織切片標本を破壊することなく、CR-39上に保持したままエッチング処理できれば、標本像とエッチピット分布とを一枚のスライド上で観察することができる。核分裂片に対して成功した例が以前に報告されたことがある。文献をよく検討し、系統的に条件を変えて試験したが、 $\alpha$ 線に対しては成功していない。そこで、組織標本とエッチピット分布像とは別々に得られるものと割り切り、この両像を顕微鏡下で重ね合わせて観察する技術を開発するという方針に切り替えて検討を進めた。なお、以下は石樽が英国 MRC にて検討した結果である。

### 2. 結果と討論

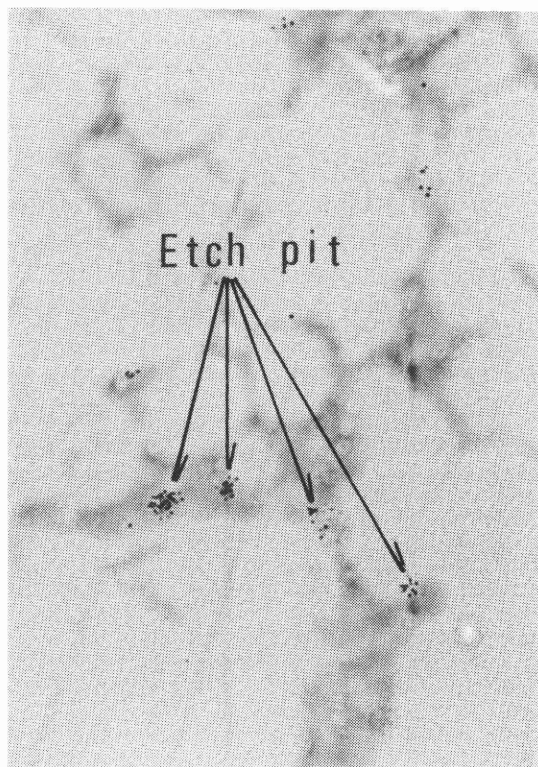
#### a. 重ね合わせ技術

まずミクロンオーダーの重ね合わせ技術に関して試験した方法の原理を記す。

$\alpha$ 放射体を含む動物組織の1対の連続切片を作成し、一方を通常のスライド上に、他方をCR-39 プラスチック上に固着する。スライドの切片は、通常の方法にならない組織切片標本とする。CR-39 上の切片に関してはエポキシ樹脂を除去した後切片の中央部分をセロテープで覆い、低エネルギーの $\alpha$ 線を照射する。CR-39のセロテープで覆われた部分には $\alpha$ 線は全く当たらない。覆われなかった部分に関し、 $\alpha$ 線のエネルギーが適切であれば、組織の存する部分は $\alpha$ 線が組織により遮蔽されCR-39に当たらない。一方、組織のない抜けた部分には $\alpha$ 線が当たることになる。これを強アルカリ溶液でエッチング処理するとCR-39上にセロテープで覆われなかった部分について切片のネガティブなイメージが、 $\alpha$ エッチピットの集合パターンとして写し取られることになる。このCR-39と前述のスライド標本とを重ね合わせ、顕微鏡で両者の像を一致させることにより、組織の微細構造をスライド標本から、エッチピット分布、即ち



(a) 組織像に焦点を合わせた写真



(b) エッチピット分布像に焦点を合わせた写真

図9 CR-39によるミクロオートラジオグラフの例

組織内の $\alpha$ 放射体分布を CR-39 から同時に観察しようとするものである。

## b. 結 果

本法の検討で使用した $\alpha$ 放射体を含む組織は、ラットの肺であり、濃縮ウランの酸化物を吸入させ、摘出したあとエポキシ樹脂に包埋したものである。

$\alpha$ エッチピットの集合によって写し取られた組織のイメージの鮮明度は、 $\alpha$ 線の照射量、 $\alpha$ 線のエネルギー、エッチング液の濃度、温度、エッチング時間等、エッチング条件に大きく左右される。これらのパラメータを系統的に広範囲に亘り変化させ試行錯誤を繰り返しながら最も鮮明なイメージの得られる条件を決定しなければならない。紙面の都合で省略するが、これらを検討した結果、組織の微細構造とエッチピット分布との重ね合わせに最終的に成功し、マイクロオートラジオグラフィとして実用性を示唆する結果が得られた。

図9に重ね合わせて撮影した写真を示す。(a)は組織像に、(b)はエッチピット分布像にそれぞれ焦点を合わせたものである。沈着した酸化ウランから放出された $\alpha$ 線が、肺胞壁の部位にエッチピットとして記録されている様子が、鮮明に観察できた。

本法を一層簡素化し、実用性を高めるために、1) 顕微鏡下での両像の重ね合わせを簡素化、迅速化すること、2)  $\alpha$ イメージと切片像との同時フォーカスを可能とすることの2点が必要である。こうした課題に関しては、次に述べる特殊仕様の顕微鏡を設計製作しほぼ達成した。つまり、この顕微鏡は2つの独立した試料ステージと鏡筒とを有し、両ステージ上の試料の顕微鏡像を光学的に合成でき、しかもこれら両ステージを同時に走査できる構造を持つものである。組織切片標本と CR-39 プラスチックとを各々のステージに載せ、両ステージを微細に操作して両試料からの像を一致させるわけである。

## (C-3) 固体飛跡検出器の $\alpha$ 線検出特性の検討

### 1. 緒 言

固体飛跡検出器のオートラジオグラフィへの応用の検討と並行して、この検出器の $\alpha$ 線検出基礎特性及び実用段階における問題点を調査検討してきた。その一部は既に58年3月をもって終了した通称「低レベル特研」の報告書に記載した。それ

以降の検討内容についてその概要を以下に報告する。

## 2. 結果と討論

### a. 画像解析装置によるエッチピットの直径計測

固体飛跡検出器へ垂直に入射した $\alpha$ 粒子の円形エッチピットの直径は、エッチングの条件や検出器個々の特性のわずかな違いにも敏感なので、これを計測することはエッチング操作の水準、検出器の品質などを維持管理するのに役立つ。本研究では TV 方式の画像解析装置をこうした計測に応用する際の誤差の評価や適切な使用法について検討した。

結果として、こうした装置によりエッチピットの直径が十分な精度で、かつ再現性よく測定できることが確認された。ただし、複数のエッチピットを計測した場合の直径分布の標準偏差に関しては、実際のばらつきよりも過大に評価される傾向がみられた。この原因として、顕微鏡の照明やビントあるいはテレビ撮像管感度等の同一視野内での非均一性が複合的に作用し合っているものと推察された。

### b. 固体飛跡検出器の製造バッチ間の差

検出器の特性の製品間のばらつきは、首尾一貫した安定な結果を得るという観点から看過することのできない問題である。

約2年に亘り同一製造者より入手したバッチの異なる7枚の CR-39 プレートについて特性を比較検討した。

まず同一バッチ内について調査したが、ばらつきはあまり大きくないことが確かめられた。また、プレートの表裏の特性についても比較したが有意な差は見られなかった。次に、異なるバッチについて調査したところ、バルクエッチング率に関しては、7枚のうち1枚を例外として、他の6枚では特性に差が無く標準偏差は2.5%であった。ところがエッチピットの直径に関しては、バルクエッチング率の小さい1枚が直径もやはり小さかったがこれを除く他の6枚においても標準偏差は大きく、10%を越えていた。エッチピットの直径はトラックエッチング率とバルクエッチング率の関数として近似的に計算することができるが、こうした関係式を用いて解析したところ、トラックエッチング率は必ずしもバルクエッチング率に比例していないという興味深い推論がなされた。

以上の結果は、使用するプレートそのものの特

表1 各因子のエッチビット径に及ぼす影響

因 子	効 果	備 考
バ ッ チ	± 10 %	7 バ ッ チ 間 の 標 準 偏 差
生 成 物	影 響 無 し	5 g / l 以 下
攪 は ん	+ 13 %	マ グ ス タ ー ラ ー
超 音 波	+ 6 %	47 kHz, 120 W
湿 度	影 響 無 し	30 ~ 50 % 以 下
	+ 9 %	85 % 以 上
	+ 44 %	50 °C で 照 射、 3 週 間 保 管
温 度	+ 12 %	38 °C        "
	影 響 無 し	- 24 °C か ら + 23 °C

性を使用に先立ち、標準的な照射法やエッチング法で確認する必要があることを示している。

#### c. バックグラウンドの評価

バックグラウンドはどの放射線測定器においても、検出感度と共に検出下限を決定する重要なファクタである。

種々の方法で保管された CR-39 検出器のバックグラウンドを一年間に亘り追跡することによって、当検出器の検出下限を評価すると共に、バックグラウンドの増加防止に有効な保管法を探り、実用上有用な結果を得た。エッチビットの計数とサイズの計測に TV 方式の画像解析装置を使用し、良好な再現性と客観性を保つこととした。

入手直後に計測したエッチビット密度から、フィルターカップ式ラドンモニタの検出下限を評価したところ、計数サイズに最適なしきい値を設け、10mm<sup>2</sup>を計数した場合その値は 60 (Bq/ m<sup>2</sup>)・月となった。検出器のバックグラウンドは保管中に増加するが露出したまま保管した場合その増加率は5.5/mm<sup>2</sup>/月であった。真空デシケータへの保管は、増加防止に効果が無かった。なお、真空リーク率は30mm Hg/月であった。一方、ポリエチレン袋へ封入するという極めて簡便な方法により、この増加率が露出保管の1/4以下に抑えられることが分かった。

#### d. 検出特性に影響する因子の検討

垂直入射α粒子のエッチビット径を指標とし、次に列記する様々な因子の検出特性への影響を評価した。

(1)環境温度、(2)環境湿度、(3)エッチング生成物の濃度依存性、(4)エッチング液のかくはんの効果。

結果を表1に示す。これらの現象が何故起きる

のか、そのメカニズムについては不明の点も多い。しかし、実験条件を注意深くコントロールすれば、再現性の高い実験結果が期待でき、当検出器は、内部被ばく研究への応用を始めとして、α粒子を検出する色々な分野への応用が期待できる。

#### 〔ま と め〕

内部被ばくの線量評価の最終的な目標を、線量当量算定式における“修正係数”や“線質係数”の見直しに置いている。これらの数値は、空气中放射能濃度の制限値などに直接影響するので、こうした研究の社会的意義は決して小さくないと考えている。この度終了した特研を、このような目標を達成するための方法論的開発段階として位置づけており、その役割はある程度果たすことができたと考えている。特に摂取放射能の初期沈着とその後の滞留パターンとをマクロなレベルで実測する技術の開発——i) 小型動物用 Pu 体外計測装置の開発、ii) 固体飛跡検出器による迅速マクロオートラジオグラフィの開発——は、線量評価のみならず、内ばくプロジェクトの他の全課題において活用が期待されるし、またミクロなレベルで体内分布特に肺深部での分布を実測するために開発した固体飛跡検出器によるマイクロオートラジオグラフィは、63年度発足予定の特別研究において、肺深部のマイクロドシメトリーを検討するための一次的データを取得するのに役立つであろう。

#### 〔謝 辞〕

マクロオートラジオグラフィ用の全身凍結切片は、61年10月に急逝された放医研の鹿島正俊博士より拝借したものである。心より謝意を表すると

共に改めて同博士の御冥福をお祈りする。

マイクロオートラジオグラフィは、主にイギリスの MRC·Radiobiology Unit にて検討したものである。同研究所の Dr. Patrick を始めとする lung group のスタッフの御協力と親切に感謝する。

肺モニタの較正法の検討においては臨床研究部の飯沼武、福田信男、遠藤真広の諸先生方及びデータ処理室の福久健二郎室長に多大な御助力を頂いた。心より謝意を表する。

最後に、中川照美、矢野文子両氏には、技術補助員として多岐に亘り御助力を賜わった。心より謝意を表する。

#### 〔研究発表〕

- 1) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Batch variations of CR-39 plastic track detector in  $\alpha$ -track registration properties. *Hoken Butsuri*, **19**, 219-223, 1984.
- 2) Ishigure, N. : Application of CR-39 plastic to rapid and quantitative macroautoradiography of  $\alpha$ -emitters in a whole body section of an experimental animal. *RADIOISOTOPES*, **34**, 101-102, 1985.
- 3) 石樽信人 : TV 方式画像解析装置によるエッチピットの直径計測・保健物理、**20**, 43-48, 1985.
- 4) 石樽信人 : CR-39 を用いた全身凍結切片における  $\alpha$  放射体のマクロ分布イメージング。放射線、**12**, 100-105, 1985.
- 5) 関口昌道、福田信男、飯沼 武 : 磁気共鳴映像法を用いた Pu 肺モニタ校正用個人ファントムの作成、保健物理、**20**, 389-392, 1985.
- 6) 関口昌道 : 低エネルギー光子肺計測における散乱線の影響のモンテカルロ法による解析。保健物理、**21**, 179-183, 1986.
- 7) 関口昌道、遠藤真広、飯沼 武、松岡 理 : 人体ファントムの X 線 CT 画像を用いた Pu 肺計測のモンテカルロ・シミュレーション。保健物理、**21**, 185-189, 1986.
- 8) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Evaluation of background in CR-39 detector for  $\alpha$ -particle detection. *Hoken Butsuri*, **22**, 287-293, 1987.
- 9) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Property of TS-16N solid state nuclear track detectors as an imaging medium for macroautoradiography of  $\alpha$ -emitters in biological specimens. *RADIOISOTOPES*, **37**, 62-67, 1988.
- 10) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Factors affecting the etching properties of CR-39 detector for  $\alpha$ -Particles. *J. Nucl. Sci. Technol.*, **25**, 404-409, 1988.

### 3. 内部被ばくの影響に関する比較動物学的研究

小木曾 洋 一, 福 田 俊, 飯 田 治 三, 山 田 裕 司,  
久保田 善 久, 松 岡 理

(内部被ばく研究部)

## Comparative Toxicological Studies on the Effects of Internal Exposures

Yoichi Oghiso, Satoshi Fukuda, Haruzo Iida, Yuji Yamada,  
Yoshihisa Kubota and Osamu Matsuoka  
Division of Comparative Radiotoxicology

〔はじめに〕

プルトニウムのような超ウラン元素による内部被曝は、その被曝様式のちがい、体内挙動の特異性、および $\alpha$ 放射線による高線量付与によって、肺および骨に重大な障害（発がん）を及ぼすことが多くの動物実験により知られているが、その発

現機構については必ずしも明確でなく、一定の線量効果関係をそのままヒトに外挿することが困難である。このことから本研究課題では、重要な標的器官である肺と骨それぞれについて、以下のようにより内部被曝の影響発現に関わる生物学的要因を比較動物学的に検討した。

#### (A) 吸入性粒子による肺線維症誘発と肺胞マクロファージの反応に関する研究

### Pulmonary Fibrosis by Inhalation of Toxic Particles and Its Relations to Pulmonary Alveolar Macrophages

It remains unclear whether or not irradiation alone by inhaled radioactive particles can induce pulmonary fibrosis in the lung. The pathogenesis of pulmonary fibrosis was studied by comparing toxic effects of several inhaled dust or mineral particles in the rat. Following the inhalation of either asbestos fibers or silica particles, pulmonary alveolar macrophages (PAM) exhibited prominent phagocytosis of particles, and migrated as carriers into bronchial lymphoid tissues or tracheobronchial lymph nodes. Histopathology of lungs after inhalation showed a typical pulmonary fibrosis

associated with macrophage- and lymphoid-cell infiltration. The PAM recovered from inhaled animals released a significant amount of lactic dehydrogenase (LDH) and  $\beta$ -glucuronidase into the cultures. The multinucleated PAM were frequently appeared in the rats with pulmonary fibrosis. When PAM recovered from inhaled animals were cultured, an enhanced release of several biologically active substances was detected. These included chemotactic factor (s), fibroblast- and lymphocyte-activating factor (s), reflecting PAM-mediated inflammatory

and immune-associated responses in the fibrotic lung induced by inhaled dusts. To further elucidate the effects of toxic particles on PAM, *in vitro* exposures of inhaled particles to PAM cultures were performed. When PAM from normal animals were incubated with or without toxic (fibrogenic) or non-toxic inert particles, active cytokines described above were only detected in the cultures exposed to either asbestos or silica particles, but not to non-fibrogenic  $\text{TiO}_2$  nor latex particles. The

## 1. 緒言

粒子状酸化物の形態をとるプルトニウム等超ウラン元素による内部被曝では、吸入被曝様式による肺障害の発現が最も重要なリスクである。これは究極的には肺がん発生につながるものであると同時に、肺線維症の誘発も高頻度でおこることが動物実験で示されているが、その線量効果関係はむしろ非確率的である。このことは本症による病変が単に放射線 ( $\alpha$ 線) による組織・細胞の損傷とその修復反応をあらわしているだけでなく、粒子状物質のもつ固有の毒性 (化学毒性) に応じて引き起こされる生物学的反応も大きく関わっていることを意味する。このような粒子毒性による肺障害誘発の機構を明らかにするため、アスベストやシリカ等肺線維症誘発性粒子を用いて吸入実験により肺における粒子挙動と病変形成過程を、また細胞培養系により粒子毒性と細胞との直接的反応機構をそれぞれ検討し、肺の肺胞マクロファージ (以下 PMA と略す) が重要な役割をもつことが示された。

## 2. 研究方法

a. 実験動物：体重300～350 gの雄ラット (Fischer 344, Wistar および ACI 系) をそれぞれ使い、実験前には感染症の無いことを確認し、すべてバリアー・システムで飼育した。

b. 吸入性粒子：アスベスト (U.I.C.C 標準 Crocidolite、および Chrysotile, Lot AX-3738-M; Dr. E.Kagan より供与)、シリカ ( $\alpha$ -quartz および Min-u-sil; Dr. A.R.Brody より供与)、フライアッシュ (Dr. R.F.Henderson より供与)、コロイド・カーボン (C11/1431a)、二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ )、工業試験用シリカ (No.3, JIS Z8901-1979)、合成ラテックス粒子

PAM exposed to fibrogenic particles also enhanced mitogen-induced lymphocyte proliferation. Such immunoregulatory capacities of PAM were restricted to a certain population separated by centrifugation on a density gradient. These findings indicate that pulmonary fibrosis can be induced by the capacity of inhaled particles to activate PAM which modulate inflammatory or proliferating responses of fibroblasts and lymphocytes.

をそれぞれ用いた。

c. 吸入実験：アスベスト粒子吸入は米国 EPA プロジェクトにもとづき ToxiGenics 社の全身吸入曝露装置を用いて10.7～11.2mg/cm<sup>3</sup>の濃度で6時間/日/5日/週の間けつ曝露を3カ月間施行した。シリカ粒子吸入は当研究所で試作した鼻部吸入曝露装置を用いて120～150mg/cm<sup>3</sup>の濃度で1時間/日/6日/週の間けつ曝露を1週間行った。

d. 肺洗浄による PAM の採取：ケタラール麻酔下放血死後、気管内に挿管してハンス液により10mlずつ計50mlの肺洗浄をおこない、約40mlの回収液を遠沈・洗浄後、気管支肺胞細胞 (BAC) をプラスチックプレートに播き、37℃、2時間培養後の付着性細胞を PAM (95%以上) とした。

e. PAM の培養：10%牛胎仔血清を含む RPMI-1640 培養液に採取した PAM を浮遊し、 $2.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ /mlの濃度でプラスチックプレートにて最高96時間まで培養した。培養後上清を採取し、ミリポアフィルターでろ過後-90℃に保存した。一部の実験では正常の PAM に上記の粒子を加えて培養した (*in vitro* 負荷試験)。

f. PAM の各種機能分析：培養した PAM から産生、放出される乳酸脱水素酵素 (LDH)、および  $\beta$ -glucuronidase 等の酵素は市販生化学キットにより測定した。また、PAM 培養上清に含まれる白血球遊走因子 (chemotactic factor; CTF) は5 $\mu$ m ポアサイズの nucleopore フィルターを装着した microchemotaxis チェンバーにて、遊走細胞数を算出した。培養上清中のインターロイキン活性は、C3H/HeJ マウス胸腺細胞の <sup>3</sup>H-TdR とりこみにより IL-1 を、また CTLL-2 細胞株の <sup>3</sup>H-TdR とりこみにより IL-2 をそれぞれ常法に従って測定した。一方、

同系動物の脾リンパ球のマイトジェン (ConA および PHA) による増殖応答に対する PAM の効果、およびラット線維芽細胞株 (NRK) 細胞の増殖に対する PAM あるいは PAM 培養上清の効果をそれぞれ  $^3\text{H}$ -TdR とりこみにより検討した。

g. 形態学的検査：吸入動物の肺および気管支リンパ節は常法に従って解剖採取後直ちに固定し、パラフィン切片あるいは樹脂包埋超薄切片により光顕・電顕観察した。一方、PAM その他

の細胞の同定のため、ペルオキシダーゼ、非特異的エステラーゼの酵素染色を、またモノクローナル抗体 (OX4, OX6, W3/13, W3/25) による間接蛍光抗体あるいは abidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) 染色をおこなった。

### 3. 結 果

a. 吸入性粒子の沈着とマクロファージによる移行：アスベストあるいはシリカ粒子を吸入したラットでは、肺胞部の PAM 内に大小の粒子が

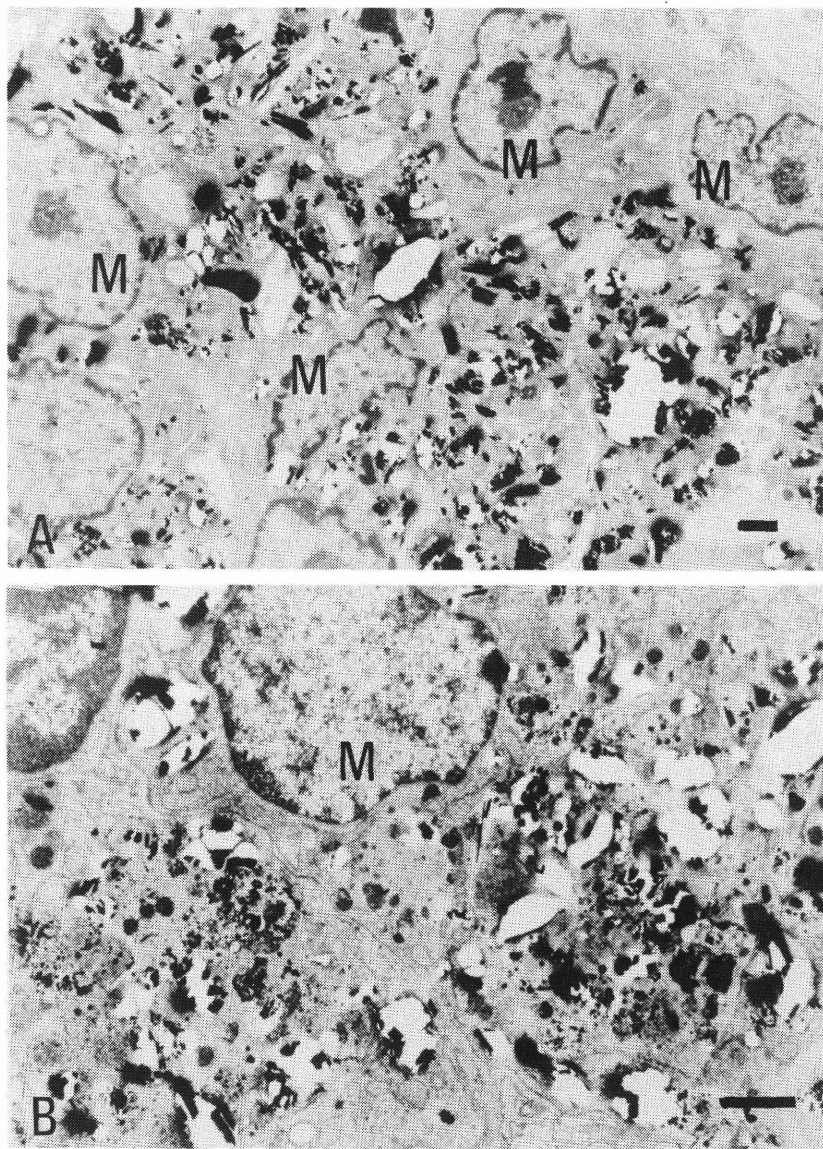


図1 アスベスト吸入ラット肺(A) および気管支リンパ節(B) の電顕像。多数の粒子をマクロファージ(M) が貪食している (スケール:  $1\ \mu\text{m}$ )。

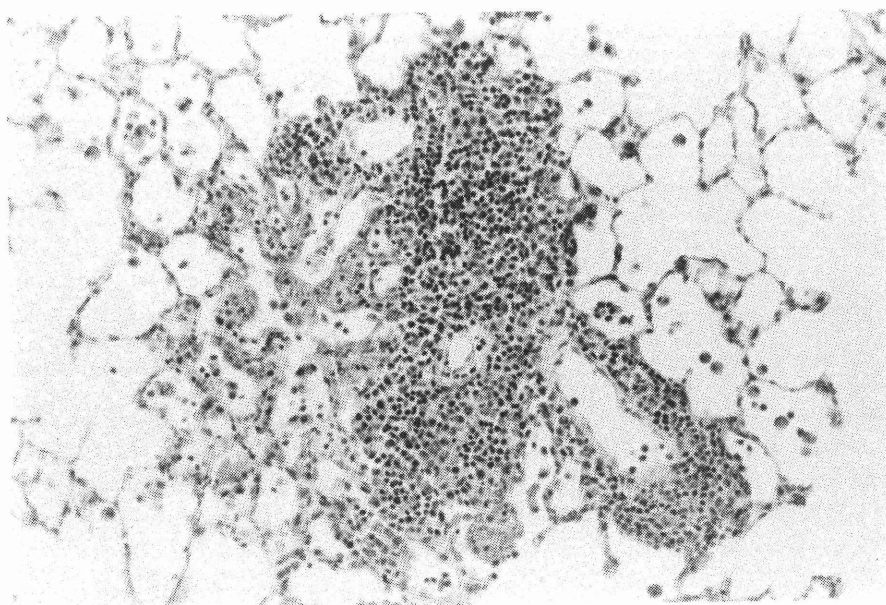


図2 シリカ吸入ラット（3ヶ月）の肺組織の炎症像（H-E染色、X200）

とりこまれ、この貪食体は長期にわたって肺胞内に滞留しているのが組織学的にも観察された（図1A）。また、吸入後の時間経過とともに肺胞壁間質および細気管支周囲リンパ組織内のマクロファージにも粒子の貪食像がみとめられるようになり、気管周囲リンパ節マクロファージにも粒子を観察することができた（図1B）。これらの所見

は吸入性粒子が肺深部においてはPAMにまずとりこまれ、マクロファージを介してリンパ節に移行しうることを示すものである。

b. 毒性粒子吸入による肺線維症の発現：アスベストや一部のシリカ粒子を吸入した動物では、細気管支—肺胞管分岐部、肺胞壁、あるいは胸膜部が、吸入後3～6カ月で肥厚しはじめ、マクロ

表1 シリカ吸入ラット肺洗浄細胞数と肺胞マクロファージの比率

吸入後時間 (月)	肺洗浄細胞回収数 ( $\times 10^{-6}$ )	細胞構成比 (%)		
		肺胞マクロファージ	リンパ球	多形核球
1	4.8 $\pm$ 1.3	89.6 $\pm$ 8.5	8.5 $\pm$ 7.2*	1.9 $\pm$ 1.5
2	5.2 $\pm$ 0.9	88.5 $\pm$ 9.7	7.7 $\pm$ 5.8*	3.8 $\pm$ 3.1
3	5.2 $\pm$ 1.4	87.5 $\pm$ 4.9	9.8 $\pm$ 4.3**	2.7 $\pm$ 1.4
4	5.7 $\pm$ 0.7	85.3 $\pm$ 5.3	12.0 $\pm$ 4.8**	2.7 $\pm$ 1.0
5	5.9 $\pm$ 1.8	92.3 $\pm$ 4.1	3.9 $\pm$ 1.7	2.1 $\pm$ 1.8
6	4.2 $\pm$ 0.9	92.9 $\pm$ 3.0	3.8 $\pm$ 1.9	3.2 $\pm$ 2.2
対 照	4.7 $\pm$ 1.4	94.5 $\pm$ 3.9	3.8 $\pm$ 2.4	1.9 $\pm$ 1.5

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.005$

表2 アスベスト吸入ラット肺洗浄細胞の変化（酵素及び形態）

グループ	Total Protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	LDH ( $\text{mU/mg protein}$ )	$\beta$ -glucuronidase ( $\text{U/mg protein}$ )	多核マクロファージ (%)
対 照	$95 \pm 42.8$	$22 \pm 15.4$	$9 \pm 4.5$	$< 1$
Chrysotile吸入	$77 \pm 18.2$	$90 \pm 32.2^*$	$21 \pm 7.3^*$	$4 \pm 1.1^{**}$
Crocidolite 吸入	$95 \pm 28.9$	$82 \pm 26.9^*$	$21 \pm 12.7^*$	$2 \pm 0.8^{**}$

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

ファージや線維芽細胞の増数とコラーゲン線維の増量、リンパ球の浸潤などの病変が顕著にみとめられた（図2）。これらは概して軽度のものが多かったが、約2割の動物では、重度の肺線維症が1年～1.5年後にみとめられた。

c. 粒子吸入動物の PAM の形態：1) アスベストまたはシリカを吸入後、肺洗浄によって得た細胞のほとんど（80%以上）は PAM であり、エステラーゼ陽性であった。しかし粒子食率は漸次減少し、1～1.5年後にはわずか数%であったが、PAM の総数はほとんど変わらなかった（表1）。また、アスベスト吸入ラットの肺洗浄液

中には有意に高い LDH および  $\beta$ -glucuronidase 活性が検出され、多核の PAM がみとめられた（表2）。これらの所見は、毒性粒子吸入によっておきた PAM の変性変化を示すものである。2) 一方、アスベストやシリカを吸入した動物では、系統や粒子によるちがいはあるが、その細胞膜上に正常値（0～3%）を上回る Ia 抗原が有意に発現されているのが特徴的であった（図3）。

d. 粒子吸入動物の PAM の機能的変化：アスベストやシリカを吸入した動物から得られた PAM を培養すると、対照に比し、有意に高い CTF 放出がみとめられた（図4）。同様にこの培養 PAM からは胸腺細胞および線維芽細胞の

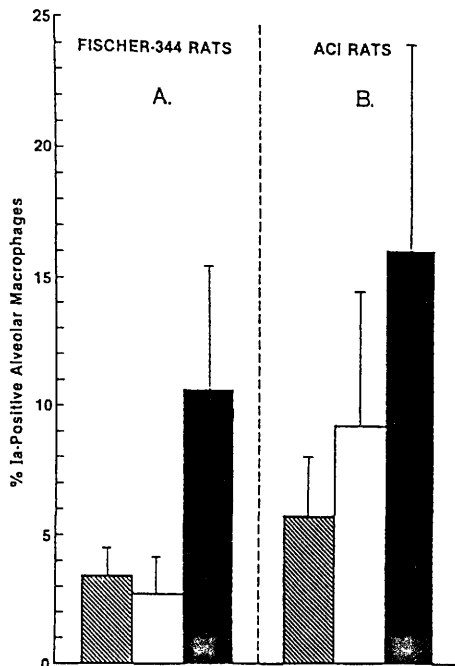


図3 アスベスト吸入ラット肺胞マクロファージの Ia 陽性率

(■: 対照, □: chrysotile 吸入, ■: crocidolite 吸入)

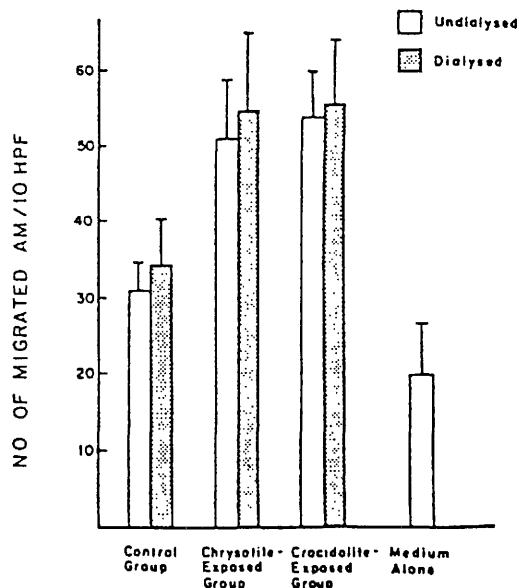


図4 アスベスト吸入ラット肺胞マクロファージによる白血球（マクロファージ）遊走因子の放出

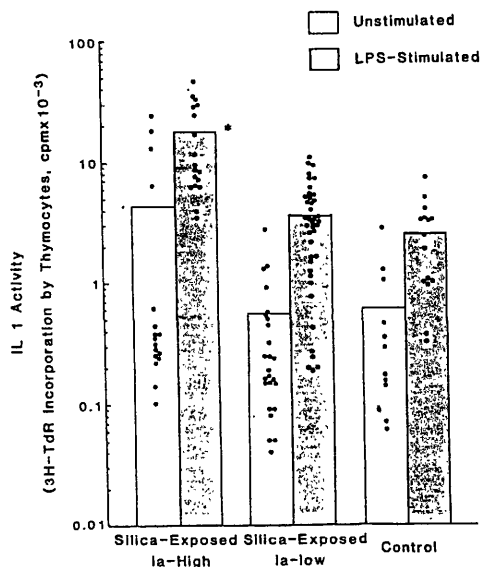


図5 シリカ吸入ラット肺胞マクロファージの Ia 陽性率と IL-1 の産生・放出  
(\*は  $p < 0.01$  で有意差を示す)

DNA 合成を増強させる分子量15000~20000ダルトンの IL-1 様サイトカインも有意に検出された (図5)。従って、アスベストやシリカ等の肺線維症誘発性粒子を吸入したときの PAM ではこれらの炎症あるいは免疫現象に関わるサイトカイン産生能が増強されることが示唆された。

e. 吸入性粒子の *in vitro* 負荷による培養 PAM の変化：次に粒子貪食 PAM によるサイトカイン産生と粒子毒性との関係をみるため、各種の粒子状物質を PAM 培養系に加えて検討した (*in vitro* 負荷試験)。アスベストやシリカ等の肺線維症誘発性粒子を貪食した PAM は IL-1 様因子を有意に産生・放出したが、このような毒性のほとんどない粒子 ( $\text{TiO}_2$ 、カーボン、ラテックス等) ではみとめられなかった (図6)。また粒子貪食 PAM を脾のリンパ球とともにマイトジェン (ConA 等) 存在下で培養すると、毒性の強い粒子を貪食した PAM ほどリンパ球の増殖応答を増強させ、毒性のない粒子をとりこんだ PAM は全く粒子を負荷しない場合とほぼ同様に何らの作用も及ぼさないことが明らかとなった (図7)。以上のことから肺線維症誘発性粒子は *in vitro* においても PAM による IL-1 産生やリンパ球増殖亢進等、免疫学的活性を誘導することが示された。

f. 粒子に対する PAM の反応性の動物種差および heterogeneity : *in vitro* 負荷試験による PAM の反応をラット以外の動物種、イヌ (ビーグル犬)、ウサギ (白色在来種) およびマウス (C3H/He 系) でも試みたが、ほぼ同様の結果を得た。従って少なくとも粒子による PAM のサイトカイン産生能については種差はないと考えられた。しかしながら、PAM を Percoll 密度勾配重層遠沈法により分画したときの各画分の粒子貪

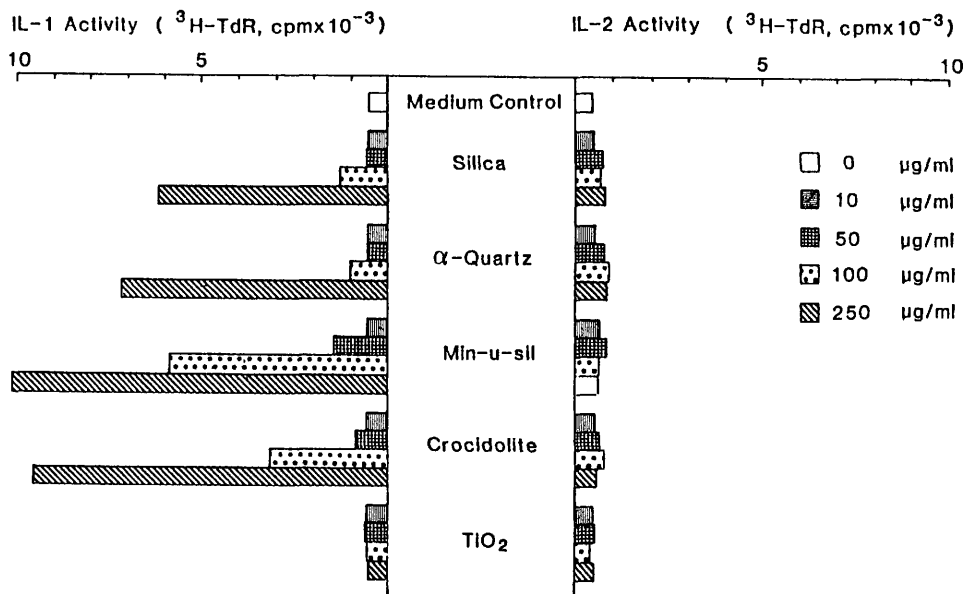


図6 粒子負荷培養ラット肺胞マクロファージの IL-1 産生と放出

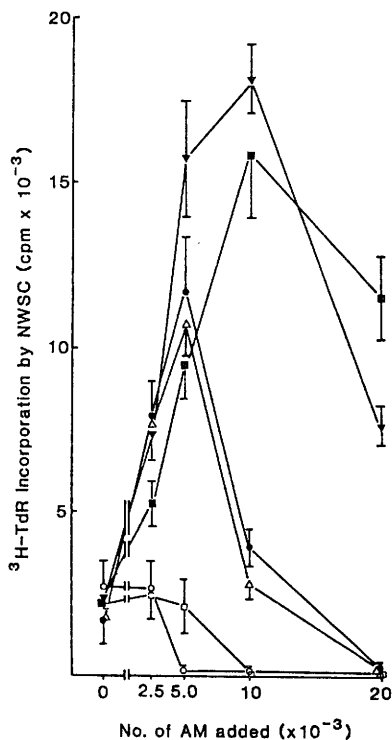


図7 粒子負荷ラット肺胞マクロファージを添加した脾リンパ球の Con A による増殖応答  
(○: 培養液のみ対照、●: シリカ、△: α-quartz シリカ、▼: Min-u-sil シリカ、■: crocidolite アスベスト、□: TiO<sub>2</sub>)

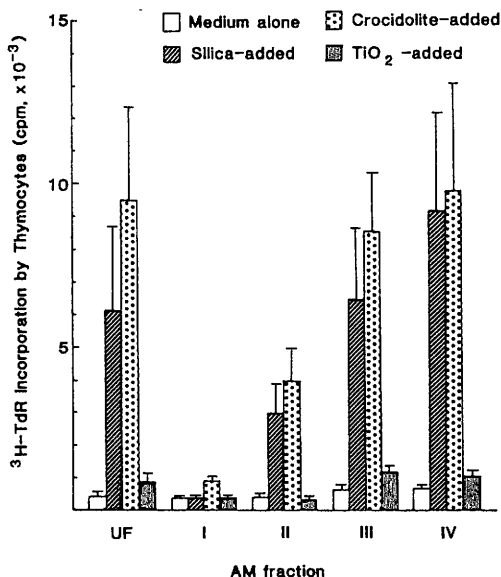


図8 ラット肺胞マクロファージ分画による粒子負荷後の IL-1 産生  
(各画分の密度: I、1.032; II、1.049; III、1.063; IV、1.074)

食による IL-1 産生やリンパ球増殖亢進は、例えばラットでは低密度画分に顕著にみられる(図8)ように、PAM の集団の中にも反応性の強弱を示す画分が混在していることが明らかにされ、マクロファージの heterogeneity が PAM にも存在していることが示唆された。

#### 4. 考 察

本研究では、吸入された粒子状放射性物質による肺線維症発現に、放射線による標的細胞の損傷だけでなく、これを修飾する細胞反応が大きく関わっていることを非放射性の肺線維症誘発性粉塵を用いて実験的に示した。すなわち、アスベストやシリカ等を吸入した動物では、粒子の沈着と挙動に肺の肺胞マクロファージ(PAM)による貪食とリンパ節への運搬・移行が支配的であり、プルトニウム等の吸入による肺胞部と気管支リンパ節への沈着・挙動様式とよく一致した。また、肺洗浄細胞から放出される LDH や β-glucuronidase 等の酵素レベルもアスベスト吸入により増加したが、これはプルトニウム吸入においてもみとめられており、変性ないし死んだ PAM によるものであることが考えられ、従って粒子の化学毒性によってもおきる初期的変化として注目される。興味あることは、プルトニウム吸入動物の場合にも報告されている2核ないし多核の PAM がアスベスト吸入動物でも有意に検出されたことである。この変化は PAM の変性変化をあらわすものと考えられたが、Ia 抗原陽性の細胞の出現とも併せて吸入によって生じた PAM の何らかの反応を示すものであろう。

また、アスベストやシリカを吸入した動物では肺線維症が発現し、その PAM を培養すると、さまざまなサイトカインの産生・放出がみとめられた。このうち、白血球遊走因子は肺における炎症細胞の滲出と集づくに、また IL-1 様因子はリンパ球の増殖に、さらに線維芽細胞増殖因子は肺間質の線維性肥厚といった組織学的病変形成にそれぞれ関わっているものと推察されるが、酸化プルトニウム等の放射性粒子の場合にもこのような現象があるか否かはまだわからない。しかしながら、粒子吸入によってこのようなサイトカインの産生とそれによる炎症、リンパ球・線維芽細胞増殖をおこす細胞がこれを貪食する PAM であることは明らかであり、しかもその活性は粒子の毒性(この場合、肺線維症誘発性)に応じて異なることが *in vitro* 負荷試験で示された。この方法

により、吸入実験 (*in vivo*) のみにならずとも、酸化プルトニウムその他の $\alpha$ 線放出粒子の毒性を比較検討することが可能と考えられる。

また、上述したような吸入性粒子に対する PAM の反応性は、粒子毒性だけでなく、PAM 自身の集団中に存在する heterogenous な亜集団によっても異なることが示されたことは、肺に生ずる病変形成にすべての PAM が関与しているわけではなく、おそらくは最初の粒子貪食とその後の運搬・移行、および後期に続発する病変それぞれのステージによってそれぞれ異なる役割を果たすと推測されるが、その解明は今後の課題である。

## 5. 結 論

プルトニウム等超ウラン元素の吸入による肺線維症誘発の毒性学的機構をアスベスト等粉塵粒子により比較検討し、以下の結論を得た。

1) 吸入性粉塵粒子の沈着と挙動およびリンパ節への移行には肺の肺胞マクロファージ (PAM) が関与する。

2) この PAM による粒子貪食に引き続いて LDH や  $\beta$ -glucuronidase 等炎症性酵素の放出がおこるとともに、多核あるいは Ia 陽性の PAM も出現する。

3) 粉塵吸入により肺線維症が発現するが、その PAM からは有意に高いサイトカインの産生・放出がみられ、白血球遊走など炎症、あるいはリンパ球・線維芽細胞の増殖といった組織病変形成と強い関連がみられた。

4) PAM によるこのような反応性は、貪食する粒子の毒性 (肺線維症誘発性) によって異なり、また PAM 集団中にも反応性の強弱をもつ heterogeneity があることが示された。

5) このような吸入性粒子に対する PAM の反応と病変発現機構との関連は酸化プルトニウム粒子吸入による肺線維症誘発の場合にも適用しうると考えられる。

## 〔謝 辞〕

本研究の一部は、米国環境保護庁 (EPA) の研究費に基づき、ジョージタウン大学、E. Kagan および D. P. Hartmann 両博士との共同研究によるものである。また、粉塵粒子を提供された米国環境保健研究所 A. R. Brody 博士およびラベレス吸入毒性研究所の R. F. Henderson 博士らに深謝する。

## 〔研究発表〕

- 1) Kagan, E., Oghiso, Y., and Hartmann, D. P. : The effects of chrysotile and crocidolite asbestos on the lower respiratory tract: analysis of bronchoalveolar lavage constituents. *Environ. Res.*, **32**, 382-397, 1983
- 2) Kagan, E., Oghiso, Y., and Hartmann, D. P. : Enhanced release of chemoattractant for alveolar macrophages after asbestos inhalation. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **128**, 680-687, 1983.
- 3) Oghiso, Y., Kagan, E., and Brody, A. R. : Intrapulmonary distribution of inhaled chrysotile and crocidolite asbestos: ultrastructural features. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **65**, 467-484, 1984.
- 4) Hartmann, D.P., Georgian, M.M., Oghiso, Y., and Kagan, E. : Enhanced interleukin activity following asbestos inhalation. *Clin. Exp. Immunol.*, **55**, 643-650, 1984.
- 5) Oghiso, Y., Kubota, Y., Fukuba, S., and Iida, H. : Interleukin 1 released from beagle alveolar macrophages exposed to dust particles. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **47**, 851-854, 1985.
- 6) Oghiso, Y., Yamada, Y., Kubota, Y., and Matsuoka, O. : Pulmonary deposition and effects of inhaled silica particles after short-term exposures in the rat. *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 1-13, 1986.
- 7) Oghiso, Y., and Kubota, Y. : Interleukin 1-like thymocyte and fibroblast activating factors from rat alveolar macrophages exposed to silica and asbestos particles. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 461-471, 1986.
- 8) Oghiso, Y., and Kubota, Y. : Heterogeneity in immunologic functions among canine alveolar macrophage subfractions. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 1124-1134, 1986.
- 9) Oghiso, Y., and Kubota, Y. : Enhanced interleukin 1 production by alveolar macrophages and increase of Ia-positive lung cells in silica-exposed rats. *Microbiol. Immunol.*, **30**, 1189-1198, 1986.

- 10) Oghiso, Y. : Heterogeneity in immunologic function of rat alveolar macrophages—their accessory cell function and IL-1 production. *Microbiol. Immunol.*, **31**, 247–260, 1987.
- 11) Oghiso, Y., and Kubota, Y. : Interleukin 1 production and accessory cell function of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particles. *Microbiol. Immunol.*, **31**, 275–287, 1987.
- 12) Oghiso, Y. : Morphologic and functional heterogeneity among rat alveolar macrophage fractions isolated by centrifugation on density gradients. *J. Leukocyte Biol.*, **42**, 188–196, 1987.

## (B) 骨代謝ならびに DTPA の毒性に関する比較動物学的研究

### Bone Metabolism and Toxicity of DTPA in Experimental Animals

Age-related changes in bone metabolism of normal beagle dogs, from 3 months to 17 years of age, were examined by the morphometric and serum biochemical values. From 3 months to 2 years of age, bone volume (BV/TV) and trabecular thickness (Th. Tb.) in the iliac trabecular bone that labeled with tetracycline and calcein increased rapidly, with the increase of body weight. On the other hand, mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR, equivalent to rate of bone turnover) decreased. The BFR at 3 months were about 11 times in males and 15 times in females, as compared to those at 2 years showing the adult type of bone metabolism. From 2 to 10 years of age, BV/TV and Th. Tb. did not remarkably change, whereas MAR and BFR had a tendency to decrease gradually with age. Parathyroid hormone level increased from 3 months to 17 years. Testosterone level increased up to 2 years and remained almost constant thereafter. Serum osteocalcin, alkaline phosphatase, and phosphorus decreased rapidly up to 2 years, although calcium did not change with age.

Effects of swimming (exercising) and lactate

calcium on osteoporotic bones in rats were examined. The BV/TV and Th. Tb. increased, but the MAR and BFR were improved to be sustained. These changes were promoted by the administration of calcium and vitamin D<sub>3</sub>.

The following results from the toxicological study on DTPA were obtained. When Zn-DTPA was injected intravenously to rats and beagle dogs, the hypocalcemia, following the increase of blood pressures and heart failure were observed. These changes were not observed by Ca-DTPA intravenous injection. On the other hand, by the oral administration of DTPA, it was observed that Ca-DTPA was more toxic than Zn-DTPA. DTPA toxicity induced the dysfunction of the kidney and liver, hemorrhage and congestion in the lamina propria and vascular expansion of the small intestine. Vascular permeability was also enhanced by both DTPAs. It was concluded that the characteristics of DTPA-toxicity was the side effects on the cardiovascular system.

Therefore, the available information should be prepared on the blood pressure and heart diseases of workers by the medical check-up at regular intervals, for DTPA administration.

## 1. 緒言

本研究は、プルトニウムなどのアクチニド元素の多くが骨親和性放射性物質であることから、①標的器官である骨への沈着機序、骨肉腫や代謝などの障害およびそれらの発現過程の解明、②骨における障害の低減化の方法の検討を併行して進め、最終的には、両者の結果を併せて放射性物質による内部被曝のリスクの低減を目的としている。現在までに、前項については実験結果の評価とそれらを人へ外挿するために実験動物の骨代謝の基礎的研究と種差を中心に、後項では現時点で最も放射性物質の体外除去効果があるキレート剤 DTPA の毒性を明らかにしながら、人体への利

用を踏まえた保健物理学的な観点からの検討を進めてきた。したがって、ここでは実験動物の骨代謝に関する研究と DTPA の毒性に関する研究を分けて述べる。

## 2. 骨代謝に関する研究

### 2-1 研究方法

a. 実験動物：ビーグル犬は3カ月から17歳齢までの雌雄170頭を用いた。ラット (Wistar rat) は若齢～老齢までの雌雄約200頭を用いた。

b. 実験モデルの作成

骨代謝が high turnover を示す骨粗鬆症のモデルを、雌ラットでは卵巣摘出と低 Ca 飼料の給餌によって、イヌでは雌に卵巣摘出、雄に精巣摘出

術を施して作成した。また、骨代謝が low turnover を示す骨軟化症モデルを成長中のラットに低 Ca 飼料を与え、犬では EHDP を投与して作成した。

#### c. 骨二重蛍光標識

骨の組織学的動態を解析する目的で、生検あるいは剖検前に、塩酸 tetracycline (25mg/kg) と Calcein (8mg/kg) を投与し骨表面の石灰化部分の蛍光標識を行った。

#### d. 骨材料

骨材料は、犬では腸骨、肋骨および肋軟骨を生検あるいは剖検にて、ラットでは頸骨と腰椎を剖検によって採取した。

#### e. 非脱灰骨組織標本

骨材料は、villanueva bone stain 液で染色、アルコールとアセトンで脱水後、methylmethacrylate に包埋した。その後、薄切、研磨し 10~15 $\mu$ m 厚の非脱灰骨組織標本を作成した。

#### f. 骨形態計測

非脱灰骨標本の骨梁骨の形態と組織動態を、骨形態計測用画像解析装置で計測した。

#### g. 骨成分の測定

骨および肋軟骨の成分は、wet, dry, Ash 重量を測定し、含有水分量、有機成分量、無機成分量を求め、その後硝酸で完全溶解後、含有 Ca と P を定量した。

#### h. 血清生化学値の測定

骨代謝に関連した血清 Ca, P, Alkaline phosphatase (ALP) は、市販の測定キットおよびオートイナライザーで、canine osteocalcin (BGP),

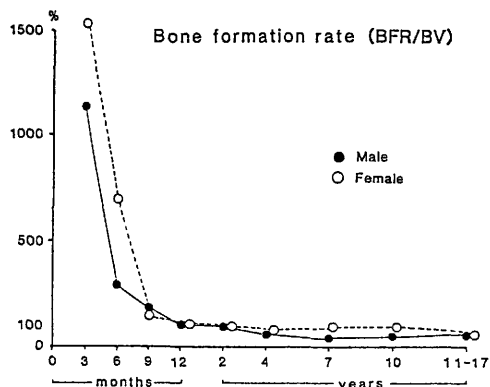


図1 ビーグル犬における腸骨骨梁骨の単位骨重の加齢性変化。表の各年齢の数値は、骨成熟年齢の2歳齢(100%)に対する比率で示した。

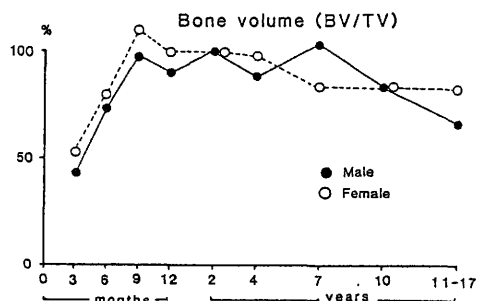


図2 腸骨骨梁骨の骨形成率 (bone turnover) の加齢性変化。表の各年齢の数値は、骨成熟年齢の2歳齢(100%)に対する比率で示した。

parathyroid hormone (PTH), calcitonine (CT) は radioimmunoassay 法で測定した。

## 2-2. 結果

a. ビーグル犬の骨代謝の加齢性変化を形態計測学的に測定した結果、骨成熟年齢である2歳齢までをみると、3~9カ月齢では単位骨量(図1)や骨梁骨の幅は急速に増加し、一方石灰化速度や骨形成率 (bone turnover) (図2) は急速に減少した。雌の3カ月齢の bone turnover は2歳齢に比べて、雄で11倍、雌で15倍の速であった。血清 Ca 値はわずかな増加傾向にとどまったが、血清 P, ALP, BGP は急速に減少した。PTH や CT は増加を示した。2歳齢以降10歳齢までは、著しい変化を示さなかったが、単位骨重、石灰化速度、turnover 値の漸減、石灰化ずれ時間や PTH の増加が見られた。

ビーグルの成犬(2歳齢)の骨形態計測値のうち単位骨量、骨梁骨幅などの静的指標値は、ヒト(腸骨)やラット(頸骨近位端)とほぼ同じ値を示した。動的指標である石灰化速度や骨形成率は、ラットとは近似した値であったが、ヒトと比べて2~2.5倍速かった。

b. ビーグル犬の肋軟骨では、3~6カ月齢の間に石灰化が始まり、9カ月齢には微細な骨折が起こっていた。2歳齢頃から、石灰化部分は骨組織化し、骨梁骨と同様な組織動態を示すようになった。10歳齢以降には石灰化部分は完全な骨折を起こしていた。(図3)これに伴って、肋軟骨の含有水分の減少、有機成分と無機成分の増加が認められた。

c. ビーグル犬に塩化アルミニウムを静脈注射で連続投与すると、骨組織は類骨の増加が見られ、骨軟化症を呈した。これは、形態的には EHDP で作成した骨軟化症と同様な状態を示した。

d. ビーグル犬の1歳齢の骨組織計測値を、屋

Age	Costal cartilage													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13th
3 months	Cal.* <sup>1</sup>	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I.F.* <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 months	Cal.	25	92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	25
	I.F.	0	17	25	42	67	75	92	83	83	75	33	17	0
9 months	Cal.	45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	78	17
	I.F.	0	18	36	64	82	100	100	100	100	90	70	0	0
4 years	Cal.	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
	I.F.	0	0	67	100	100	100	100	100	100	100	83	40	0
More than	Cal.	29	86	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11 years	I.F.	0	14	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
	C.F.* <sup>3</sup>	0	0	0	14	29	71	71	43	71	71	14	0	0

\*<sup>1</sup> Cal.; Calcified, \*<sup>2</sup> I.F.; Incomplete Fracture,

\*<sup>3</sup> C.F.; Complete Fracture

図3 軟X線写真によるビーグル犬の肋軟骨の石灰化と骨折の加齢変化。6カ月齢では、第3～11肋軟骨のすべてが石灰化し、微細な不完全骨折がみられた。以後、石灰化と微細な骨折は増加し、11歳齢以降では完全骨折が認められた。

外で運動させながら育成した群と、屋内でケージ内運動させた群について比べた結果、両者間で有意な差は認められなかった。

e. 遺伝的な系統が異なるビーグル犬の異腹仔間で骨形態計測値を比べたが、各腹間で有意な差は見られなかった。

f. 骨粗鬆症および骨軟化症モデルラットに水泳による運動負荷を加えると、単位骨量や骨梁骨幅の増加および turnover 率の正常化が見られた。また、標準 Ca 量含飼料および発酵乳酸カルシウムに Vitamin D<sub>3</sub> を同時に与えると、より一層の骨代謝改善が認められた。

## 2-3. 討 論

ビーグル犬は骨代謝様式が、ヒトのそれと類似しているので、Pu 等の骨障害を研究する上で重要な動物であるが、加齢に伴う骨代謝を骨形態計測値および血清生化学値から検討した結果、3～

9カ月齢まで modeling と remodeling により著しい成長を示し、2歳齢までに骨成熟を示した。これは、前特別研究において、四肢長骨の骨端線の形態変化や長さを指標にして骨成長を観察した結果と一致していた。今回特に骨端線の消失する2歳齢以降の代謝性変化に注目したが、雌では7歳齢頃から僅かな骨量の減少や代謝速度の低下が示唆されたが、雄では変化はみられなかった。ヒトでは閉経と骨粗鬆症（骨量の減少）との関係は明らかであるが、雌犬での骨量の漸減傾向は閉経が認められないが、性ホルモンや排卵数の減少がみられることや PTH の増加に起因するものと考えられる。雄では PTH が増加傾向示したが、テストステロンレベルは16歳まで減少がみられないので、骨量減少を防止していると推察された。したがって、老齢期では犬と人の骨代謝には種差が認められた。肋軟骨の石灰化は犬、ラットおよび

人のいずれにおいても認められる共通した加齢減少で、Pu の骨沈着や骨折などの障害との関連が今後の課題となる。

## 2-4. 結 論

犬の骨代謝に関する基礎データを蓄積し、人との類似点あるいは相違点を明らかにした。また、骨代謝異常を示す代表的な骨粗鬆症や骨軟化症のモデルを犬とラットで作成し、内的および外的要因による骨代謝の変化を確認した。これらの成果はプルトニウムの骨内挙動や障害リスクを評価する上で役立つことが期待される。

## 3. DTPA の毒性に関する研究

### 3-1. 研究方法

a. 実験動物：ビーグル犬38頭および Wistar ラット457頭を用いた。

#### b. DTPA の調製

CaNa<sub>3</sub>DTPA および ZnNa<sub>3</sub>DTPA (DOTITE) を購入し、経口投与では粉末のまま、静脈内投与では生理食塩水で 450 $\mu$ mol/ml の濃度に溶解、pH を7.2~7.4に調製してこれを原液とし、必要に応じて濃度を調製して使用した。

#### c. DTPA の投与量および方法

ラットの経口投与は、Ca-DTPA および Zn-DTPA の 30, 150 $\mu$ mol/kg を飲水に混ぜ、静脈内投与は 30, 150, 300, 600, 900 $\mu$ mol/kg を舌静脈から 0.008~0.012ml/s の速度で注入して行った。

犬の経口投与は、Zn-DTPA の 30, 150 $\mu$ mol/kg を局方カプセルに入れ、静脈内投与は 30 $\mu$ mol/kg, 150 $\mu$ mol/kg を正中皮静脈から 0.008~0.012ml/s の速度で注入した。

#### d. 血圧、脈搏および心電図の測定

薬理試験において血圧、脈搏、心電図の測定を行う目的で、ラットおよび犬ともに麻酔し、血圧や心電図の波形が安定した後に、小動物用および犬用血圧、脈搏、心電図測定装置を用いて測定した。

#### e. 血清 Ca, Ca イオン、pH 濃度の測定

DTPA 投与前および投与後 5~10 分間隔で採血し、血清分離後、Ca は o-cresolphthalein 法で、Ca イオンおよび pH は Ca イオン濃度測定装置で、それぞれ測定した。

#### f. 血液、血清生化学成分の測定

赤血球 (RBC)、白血球 (WBC)、ヘモグロビン (Hb) 量は自動血球測定装置、ヘマトクリット (Ht) 値は超遠心法、総蛋白量 (TP) は屈折法、

GOT, GPT, ALP, BUN, Creatinine はオートアナライザーで測定した。

#### g. 病理学的検索

実験終了時に解剖学的検索を行った後、HE 染色組織標本を作製して組織学的な観察を行った。

#### h. 血管透過性試験

①ラットの背側中央部を剃毛し、2.8~22.5  $\mu$ mol の間で5段階に濃度調製した Ca-DTPA あるいは Zn-DTPA の溶液および対照として生理食塩水をそれぞれ 0.05ml づつ皮内注射した。その後、0.1% の Evans Blue Dye 溶液 (EBD) 0.5ml を静脈投与して、DTPA 投与部位の青色斑の直径を測定した。② Epinephrine (0.08mg/kg) を20分前に投与し、①と同様な処置を行った。③ Zn-DTPA を静脈投与した後、EBD を静脈内投与した。④消化管 (胃~大腸) に Zn-DTPA (450 $\mu$ mol/ml) 溶液を注入した後、EBD を静脈注射して、青染の経時的变化を肉眼的に観察した。

#### i. 粒子状物質の挙動への影響

粒子状物質 (カーボン粒子) を投与したラットに DTPA を静脈注射して、腎臓や消化管での沈着部位を組織学的に検索した。

## 3-2. 結 果

### a. 経口投与

ラットに Ca-DTPA あるいは Zn-DTPA を経口で1~3カ月投与した結果、いずれの群でも体重の減少や異常な臨床所見は見られなかった。しかし、Ca-DTPA の 30 $\mu$ mol/kg 群では、投与1カ月後に RBC の減少、BUN, WBC および ALP の上昇、3カ月後に ALP の上昇がみられた。Ca-DTPA の 300 $\mu$ mol/kg 群では、投与1カ月後に RBC の減少、GOT, GPT, ALP の上昇、3カ月後に GPT, ALP の上昇がみられた。

Zn-DTPA の 30 $\mu$ mol/kg 群では、投与1カ月後に creatinine の上昇、3カ月後に Ht、6カ月後に Ht, Hb, GPT の上昇がみられた。300 $\mu$ mol/kg 群では、投与1カ月後に Ht, BUN、6カ月後に GPT の上昇がみられた。解剖時の観察では、Ca-DTPA および Zn-DTPA 投与の全群でもに十二指腸、空腸の充出血がみられたが、Ca-DTPA の30および 300 $\mu$ mol/kg 群の1カ月後で最も著しかった。ビーグル犬では、Zn-DTPA 30 $\mu$ mol/kg 群で BUN の上昇、150 $\mu$ mol/kg 群で GOT, GPT, BUN の上昇がみられたが、300 $\mu$ mol/kg 群では有意な変化は認められなかった。解剖組織学的観察では、ラットお

よびビーグル犬の全群に小腸粘膜の充出血、粘膜下織の血管拡張がみられ、とくに  $30\mu\text{mol/kg}$  群の腎臓の近位尿細管にわずかではあるが hemo-siderin の沈着がみられた。また、犬での Zn-DTPA の吸収率は、 $4.8\sim 7.1\%$  であった。

#### b. 静脈投与

ラットおよび犬ともに Zn-DTPA の静脈投与直後に、投与量に応じて一時的な低 Ca 血症 (図 4)、および血圧の上昇、脈搏の増加、心電図の異常が認められた (図 5、6)。

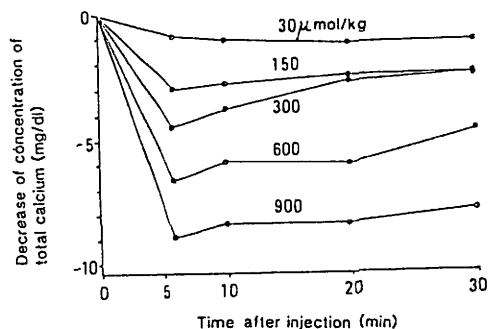


図 4 Zn-DTPA 静脈投与後の血清カルシウム濃度の経時的変化。投与量に応じて、カルシウムの減少が認められる。

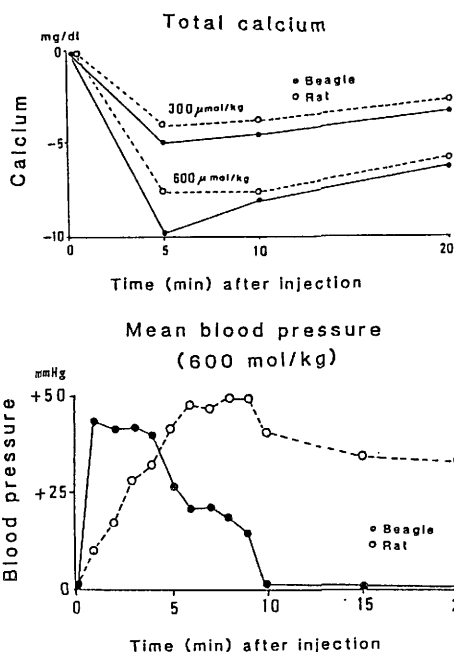
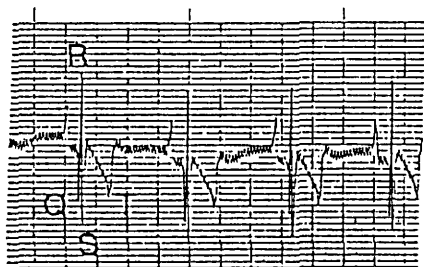
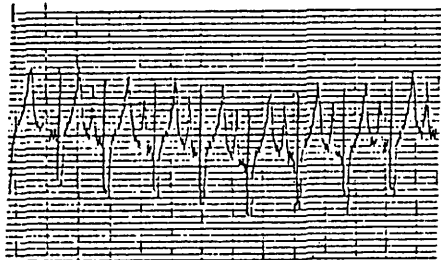


図 5 犬およびラットに Zn-DTPA を投与すると、血清カルシウム濃度の低下に伴って、血圧が上昇する。この反応に動物種差は見られなかった。

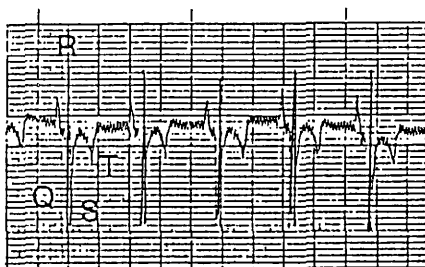
#### Before injection



#### 5 min after injection



#### Before injection



#### 5 min after injection

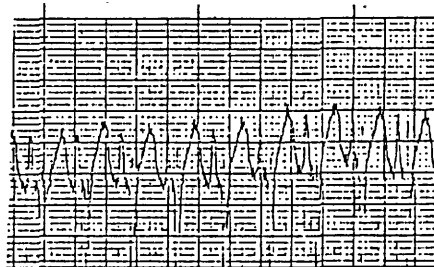


図 6 犬に Zn-DTPA を静脈投与した後に観察される異常な心電図。上段は投与前、下段は投与 5 分後。

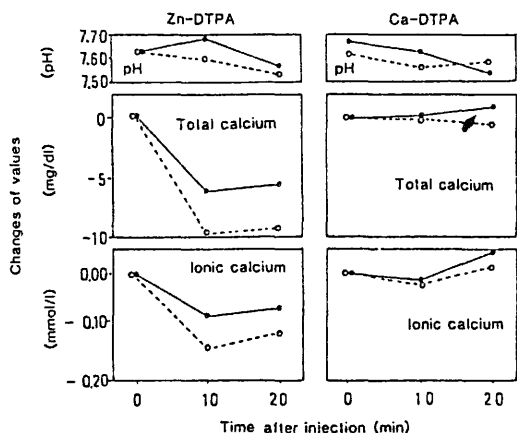


図7 Zn-DTPA および Ca-DTPA 静脈投与に伴う血清総カルシウム、カルシウムイオン濃度、pH の変化。Ca-DTPA では、低カルシウム血症は起こらない。

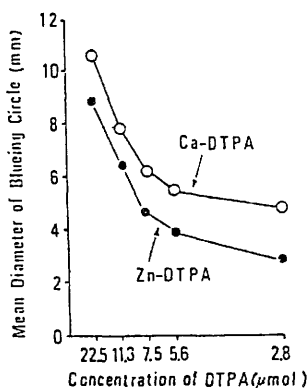


図8 血管透過性試験において、測定された青色斑の直径。濃度に対応して、青色斑の直径が変化し、Ca-DTPA の方が、Zn-DTPA より作用が強いことを示す。

しかし、Ca-DTPA では全く変化は見られなかった (図7)。また、犬に Zn-DTPA を1カ月連続投与した結果、嘔吐や下痢などの臨床的な異常所見は見られなかった。しかし、投与2週以降明らかな体重の減少が認められた。血清生化学値や組織所見から、経口投与の場合と同様に肝臓、腎臓の軽度の障害および腸粘膜の充血が認められた。

#### c. 血管透過性亢進作用

Ca-DTPA および Zn-DTPA を皮内投与した部位や注入した腸管において、明らかな青色斑や色素の漏出が認められた (図8)。これは Epinephrine の前処置により、抑制された (図9)。

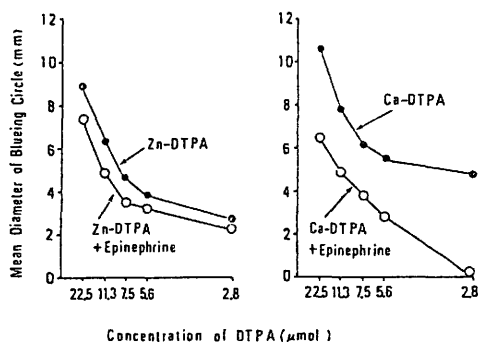


図9 Epinephrine 前処置後の血管透過性を表す青色斑の直径。DTPA による血管透過性は Epinephrine によって抑制される。

#### d. 粒子状物質の挙動への影響

粒子状物質 (カーボン粒子) を投与したラットの組織学的検索の結果、腎臓の糸球体外 (ボーマン氏嚢) や消化管の毛細血管外への粒子状物質の漏出が疑われた。

#### 3-3. 討論

従来、Ca-DTPA は Zn-DTPA よりも毒性が強いと報告されていたが、この知見は経口投与では報告通りであったが、静脈内投与では逆に Zn-DTPA の方が強い毒性を示すことを今回の一連の実験から明らかにした。

これは、 $\text{ZnNa}_3\text{DTPA} + \text{Ca} \rightarrow \text{ZnCaNaDT-PA} + 2\text{Na}^+$  によるもので、このため Zn-DTPA を静脈内注射すると血液中の Ca 濃度の急激な減少がおり、これに伴って心不全が現われると認められた。

また、局所的には、EBD の漏出から血管透過性亢進作用が現われることが認められたが、この場合には Ca-DTPA の方が作用は強かった。ここでみられた全身と局所における DTPA の作用機序の相違の解明は今後の課題である。また、局所の血管透過性亢進作用によって、粒子状物質が血管から漏出している可能性があることから、DTPA をプルトニウム等の体外除去の目的で投与しても、完全に除去できないだけでなく、返って部分的には組織内への沈着を促進する可能性が推察された。

DTPA の毒性は、今回の実験の結果から循環器系に現われることが明らかで、とくに静脈注射による DTPA の投与速度や循環器系への特別な注意と日常の放射線作業者の健康管理に心機能検査を加える必要性が示唆された。

ラットと犬における DTPA の毒性の種差は、

ほとんど認められないことから、動物実験で得られたデータは人での毒性を推定する上で役立つと考えられる。一般に人体への推奨投与量とされている  $30\mu\text{mol/kg}$  では、著しい毒性は認められなかったが、消化管の粘膜の充血、肝臓や腎臓の障害が軽度ながらもあることから、長期間投与を行う場合には、慎重な対処が必要である。

### 3-4. 結 論

Ca-DTPA と Zn-DTPA の毒性は、投与方法によって異なり、静脈投与では Ca-DTPA が安全であることが認められた。また、同一量による毒性発現の強さには動物の種差がほとんど認められず、発現部位は循環器系であることを明らかにした。

### 〔研究発表〕

- 1) Fukuda, S. and Iida, H. : Age related changes in bone metabolism of normal beagle dogs: histomorphometric and serum biochemical study. *Bone and Mineral* (In press).
- 2) Fukuda, S. and Iida, H. : Variation in bone histomorphometric values in beagle dogs between two different breeding colonies and among different litters. Individual variation. *J. B. M. M.* (In press).
- 3) 福田 俊、飯田治三、ビーグル犬の成長に伴う骨代謝の変化、骨形態計測ハンドブック、**8**.
- 4) Fukuda, S. : Calcification and fracture of

costal cartilage in beagle dogs. *Jpn. J. Vet. Sci.* **50**, 1009-1013, 1988.

- 5) Fukuda, S., Nagashima, H., Morioka, K. and Aoki, J. : Fluctuations in peripheral serum testosterone levels within a day, with age and by sexual stimulation in male beagle dogs bred indoors. *Exp. Anim.* **37**, 381-386, 1988.
- 6) Fukuda, S., Iida, H. and Yamagiwa, J. : Toxicological study of DTPA as a drug (II), Chronic side effects of orally administered DTPA to rats. *Hoken Butsuri*, **19**, 119-126, 1984.
- 7) Fukuda, S., Iida, H. and Oghiso, Y. : The enhancement of vascular permeability by DTPA. *Hoken Butsuri*, **20**, 13-18, 1985.
- 8) Fukuda, S., Yamagiwa, J. and Iida, H. : Effects of intravenously injected DTPA on cardiovascular system in rats. *Hoken Butsuri*, **21**, 245-250, 1986.
- 9) Fukuda, S. and Iida, H. : Toxicological study of DTPA as a drug (III), side effects of orally administered Zn-DTPA to beagles. *Hoken Butsuri*, **22**, 439-444, 1987.
- 10) Fukuda, S. and Iida, H. : Toxicological study of DTPA as a drug (IV), effects of intravenously injected DTPA on cardiovascular system in beagle dogs. *Hoken Butsuri*, **23**, 195-199, 1988.

## 4. アルファ廃棄物の処理技術に関する研究

小 泉 彰, 山 田 裕 司, 宮 本 勝 宏 (内部被ばく研究部)

### Studies on Treatment of Alpha-Radioactive Wastes

Akira Koizumi, Yuji Yamada and Katsuhiro Miyamoto  
Division of Comparative Radiotoxicology

Penetrations through several kinds of air filters were measured using dioctyl phthalate (DOP) particles, ambient particles and polystyrene latex particles. The tested filters were a Whatman GF/A filter, a HEPA filter media, a ULPA filter media, and a medium-efficiency filter media. The particle concentration measurements were performed by an automated diffusion battery (DB)/condensation nucleus counter (CNC) submicron-sizing system and a laser particle spectrometer.

It was found that the most penetrating particle sizes through the GF/A and HEPA filter were in a size from 0.10 to 0.18  $\mu\text{m}$  in diameter. The values of penetration through the GF/A filter by two different particle-measuring methods, the combined CNC/DB system and the laser particle spectrometer, were consistent with each other in the limited size from 0.12 to 0.42  $\mu\text{m}$ . No significant difference between the penetration curve of DOP particles and that of ambient particles was observed.

#### 1. 緒 言

プルトニウムを始めとする超ウラン元素の内部被曝安全性研究においては、放射性廃棄物処理技術の確立が研究の成否の鍵となるといって過言ではない。特に、動物実験に伴う動物由来の廃棄物、吸入実験に伴うプルトニウム排ガスなどは、従来の技術のみでは安全上の課題の残るものが多い。本研究課題は超ウラン元素の内部被曝安全性研究における放射性廃棄物処理の基本方針を定め、設

It was also found that neutralization of charges on particle surface by using  $^{85}\text{Kr}$  radiation, gives higher penetration through the air filter. The collection efficiency of ULPA media was distinctly higher than HEPA filter media, and the penetration through tandem filter was equal to the product of penetrations of each filter.

Based on the above data, a numerical experiment was made in order to estimate a relationship between DF (Decontamination Factor) and the efficiency. From the results, new standard particle size, in which the minimum DF is able to be easily obtained, was proposed. In the experiments of multi-stage filtration system, lower values of DF was possible to be experimentally indicated in the second and the third stages, even if the collection performance of the each filter is the same. The suitability of this numerical experiment was verified by filtration experiments using radioactive  $^{198}\text{Au}$  aerosols.

備の設計、建設を進め、さらに実験施設としての安全性を評価することが目標である。

アルファ廃棄物の処理技術は、固体廃棄物、液体廃棄物および気体廃棄物の、3つに大別される。生物学的安全性研究に伴う廃棄物には動物実験から排出される動物死体、排泄物を含んだ排水、の2つが廃棄物処理技術として検討を要する課題であった。この固体廃棄物と液体廃棄物の処理については、前特別研究(昭和48-57年度)の主たる検討課題であり、図1に示す処理システムを設計

し、本特別研究期間中には建設及び試運転・調整を完了させ、コールドラン、RI ホットランを経て、その健全性を確認した。

超ウラン元素の内部被曝研究における気体廃棄物としては吸入投与実験におけるプルトニウムエアロゾルの排気があり、さらに固体・液体廃棄物の最終的な処理として導入した焼却設備の排ガスがあった。これらの気体廃棄物は比較的プルトニウムの濃度が高く、実験施設の安全性を左右する重要な廃棄物である。このような気体廃棄物の処理には、エアロゾルが処理対象であるので、通常HEPA フィルタに代表される排気フィルタが用いられる。そこで本特別研究では施設の安全性評価の基礎的資料を得るため、排気フィルタの性能について最新の計測技術によって再評価する研究を行なった。本報告ではこの排気フィルタの性能評価に関する成果を報告する。

## 2. 研究方法

### a. 排気フィルタの捕集性能試験

排気フィルタの捕集性能を検討する手順として、はじめに基本的な捕集特性を調べるため、フ

ィルタ素材ろ紙 (14.5×14.5cm) による性能試験を行ない、次に実際の排気フィルタ設備で製品となった排気フィルタの試験を行った。図2に素材ろ紙を用いた実験系の概略図を示す。試験に用いたフィルタろ紙は、HEPA フィルタ、中性能フィルタ、近年開発され、市販されるようになったULPA フィルタの素材ろ紙および繊維径など基本性状の明らかとなっている Whatman 社製のGF/A 型フィルタろ紙である。試験フィルタの実効ろ過面積は210m<sup>2</sup>であった。

試験用ダクトは、長さ約2mのステンレス製、断面が14.5cm角であり、リークによる誤差を避けるため、ダクト内をプラス圧の状態に試験した。フィルタを通過する空気の流れのろ過面風速は、各フィルタの種類、仕様により本来異なるものであるが、本研究では HEPA フィルタの平均的な面風速である2.4cm/s を標準風速とした。

試験エアロゾル粒子には、多分散 DOP (diocetyl phthalate) 粒子、単分散ポリスチレンラテック (PSL) 粒子および空気中に浮遊している大気塵粒子を用いた。PSL 粒子はエアロゾル化するプロセスで帯電し易く、帯電粒子は無帯電の場

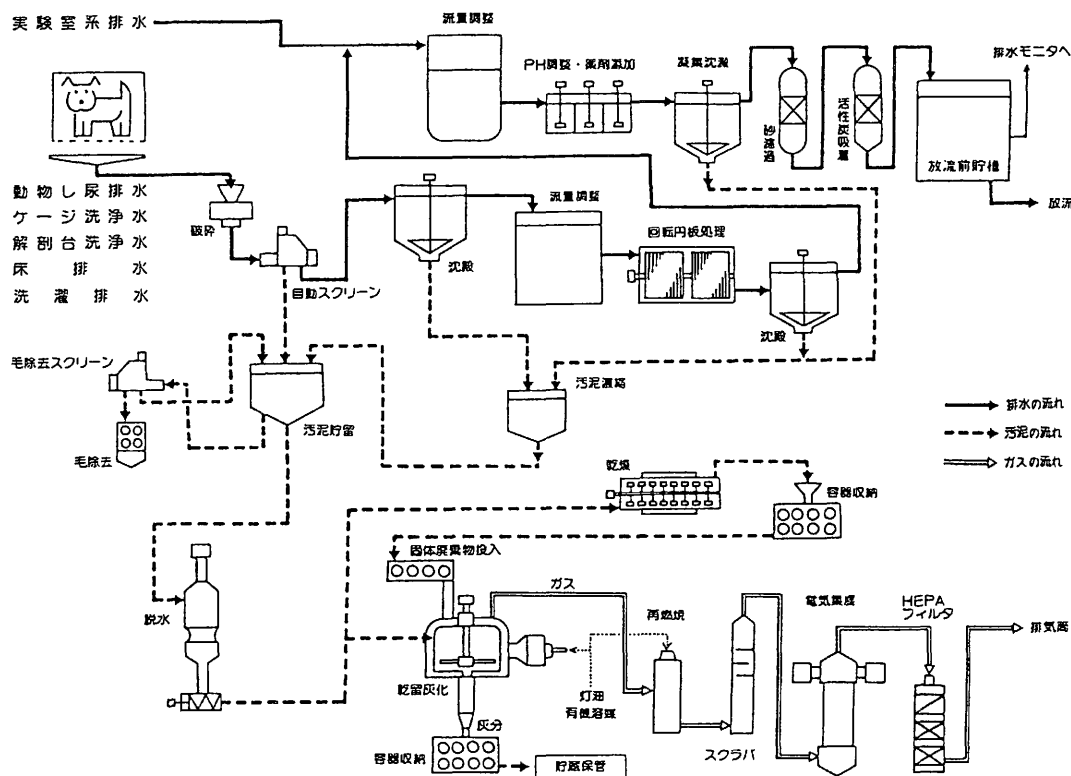


図1 内部被曝実験施設廃棄物処理ブロックフロー図

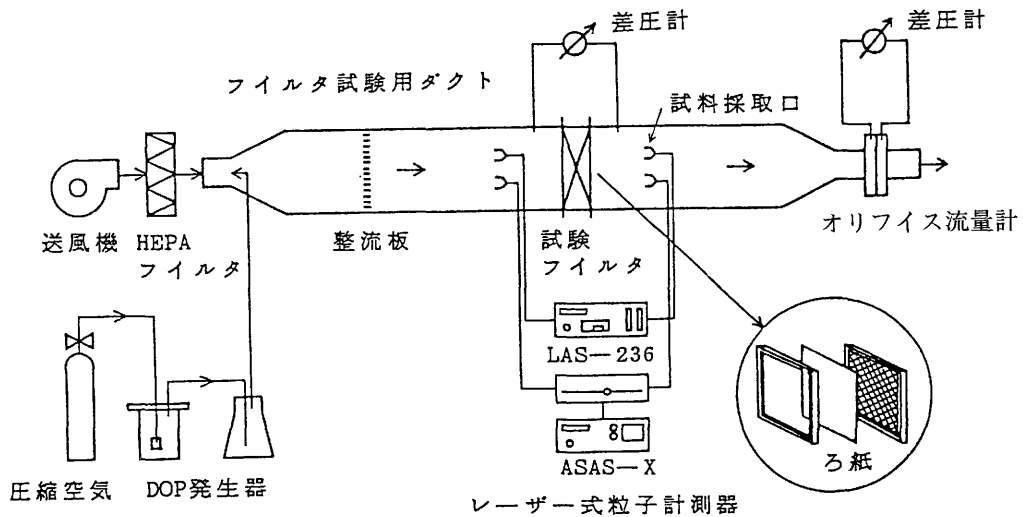


図2 シート状フィルタを用いた透過実験の装置略図

合と異なる挙動を示すと考えられるため、 $^{85}\text{Kr}$ 放射線源による電気的中和（電荷分布をボルツマン平衡分布にする）処理を行ない、中和処理の有無による透過率の変化を調べた。

フィルタの試験には従来、白色光散乱式カウンタが多用されているが、白色光散乱式カウンタは $0.3\mu\text{m}$ 以下のエアロゾル粒子の計測が困難である。本研究では、さらに小さい粒子径まで明らかにするためレーザー光散乱式スペクトロメータ（PMS社製LAS-X）および拡散バッテリー（DB）を接続した凝縮核測定器（CNC）を用いた。LAS-Xは $0.1\mu\text{m}$ 以上の、CNC+DBは $0.01\mu\text{m}$ 以上のエアロゾル粒子を分級、計測できる。

実際の排気フィルタ設備を用いた、製品となった排気フィルタの捕集効率試験は、試験エアロゾルに多分散DOP粒子を用い、他の測定方法は上記と同様である。

#### b. 捕集効率と除染係数の相関性の解析

排気フィルタの捕集効率と除染係数はしばしば同一視されるが、両者には大きな隔たりがある。この違いを明らかにし、さらに両者の相関性を定量的に示すため、数値解析によるシミュレーションを行ない、HEPAフィルタの除染係数DFを評価した。

フィルタの透過率が粒子径 $d_p$ の関数 $P(d_p)$ で与えられるようなフィルタを考える。このフィルタを用いて、粒度分布関数 $f(d_p)$ で与えられるエアロゾル粒子をろ過したとき、エアロゾル粒度分布関数が変化し $g(d_p)$ になったとする。このときの3者の関係式は、

$$g(d_p) = f(d_p) \cdot P(d_p) \quad (1)$$

となる。フィルタの除染係数DFとは、フィルタ前後の放射能比で定義され、

$$DF = \frac{\int_0^\infty F(d_p) \cdot D(d_p)}{\int_0^\infty G(d_p) \cdot d(d_p)} \quad (2)$$

で与えられる。ただし、 $F(d_p)$ はフィルタ上流側における放射性エアロゾルの放射能基準粒度分布関数、 $G(d_p)$ はフィルタ下流における分布関数である。ところが、粒度分布関数を放射能基準で求めることは容易でなく、個数基準から放射能基準に換算し直す必要がある。この換算関数を $C(d_p)$ とすると、(2)式は、

$$DF = \frac{\int_0^\infty C(d_p) \cdot f(d_p) \cdot d(d_p)}{\int_0^\infty C(d_p) \cdot P(d_p) \cdot f(d_p) \cdot d(d_p)} \quad (3)$$

これらの積分は解析的に解くことができないので、シンプソン法による数値積分をマイクロコンピュータ上で行った。

捕集対象となるエアロゾル粒子については、形状は球形、粒子密度は $1\text{ g/cm}^3$ 、放射能は体積に比例するとし、粒度分布は対数正規分布を仮定した。

#### c. $^{196}\text{Au}$ エアロゾルによる除染係数評価法の検証

##### 1) エアフィルタの透過率曲線の測定

エアフィルタの除染係数を、そのフィルタ固有

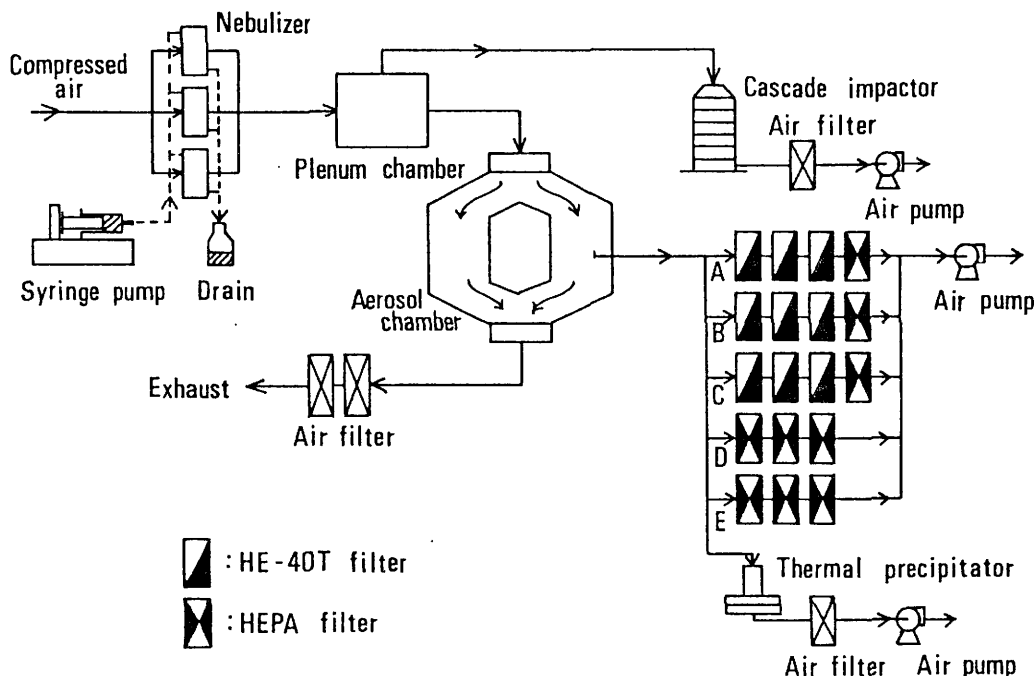


図3  $^{198}\text{Au}$  エアロゾルに対する DF 測定の実験フロー

の粒子捕集性能である透過率曲線から求める上記の評価法を放射性エアロゾルの捕集試験によって検証した。

まず、フィルタの基礎特性である透過率曲線を、DOP 多分散エアロゾルを用いて測定した。DOP エアロゾルの発生には、ロイコ社製発生器（モデル258）を、発生圧力 50kPa で使用した。フィルタの DOP エアロゾル粒子透過率は、フィルタの上流、及び下流における DOP エアロゾル粒子の個数濃度をレーザー式粒子計測器（PMS 社製 LAS-X 型）で粒子径別に測定し、その個数濃度比から粒子径別透過率を求めた。

用いたフィルタは、放射性ダストのサンプリング用として多用されている東洋ろ紙社製 HE-40T 型ろ紙、および HEPA フィルタの素材である忍足研究所社製 SO 型ろ紙を用いた。HEPA フィルタに使用される SO 型ろ紙の放射能除染係数 DF はかなり大きく、特にその多段フィルタにおいては極めて大きく、実験で DF 値を得ることがほとんど不可能であると予測された。このため実験データがより得やすいフィルタとして、HE-40T を使用した。

HE-40T、HEPA フィルタそれぞれの有効濾過面積、面風速は、HE-40T が直径40mm、1.33cm/s、HEPA フィルタが直径46mm、1 cm/s であ

った。

## 2) $^{198}\text{Au}$ エアロゾルの対する DF の測定

$^{198}\text{Au}$  に非放射性の塩化金酸を加えてコロイド化し、安定剤としてゼラチを加えて  $^{198}\text{Au}$  コロイド溶液を作り、図3に示すネブライザ3台によってエアロゾル化した。試験フィルタには、前述の DOP エアロゾル粒子透過率測定によって、その個体毎の基礎特性を明らかにしたフィルタを使用した。なお  $^{198}\text{Au}$  エアロゾルに対するサンプリング流量率は、DOP エアロゾル透過試験時と同一の条件で行なった。

フィルタ各段の放射能除染係数 DF は、フィルタで捕集された放射エネルギーに対するそのフィルタを通過した放射エネルギーの比から求めた。すなわち、S 段目のフィルタの除染係数 DF(S) は、

$$\text{DF} = A(S) / (A(S+1) + A(S+2) + \dots)$$

$$= A(S) / \sum_{i=S+1} A(i)$$

で与えられる。ここで、 $A(S)$  は S 段目フィルタに捕集された放射エネルギーである。

フィルタサンプルの  $^{198}\text{Au}$  放射能測定には、ウェル型の NaI シンチレーションカウンタ（Beckman, Gamma5500 型）を用い、各サンプルを30分間測定した。

これらのフィルタサンプリングと並行して、 $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子の性状を調べるため、カスケードインパクト (California Measurements Inc., PC-2 型) を用い、 $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子の放射能基準粒度分布を求めた。インパクト各段の50%カットオフ粒子径は、1段目の $35.4\mu\text{m}$ から最終10段目の $0.0707\mu\text{m}$ までである。ただし、これらの粒子径は粒子密度が $1\text{ g/cm}^3$ と仮定して計算された。カスケードインパクト各段に捕集されたエアロゾル粒子の放射能測定には、GM カウンタ (アロカ、GP-14V 型) を用い、各段を5分間測定した。

### 3) 数値シミュレーションによる DF の予測方法

フィルタの粒子径別透過率は DOP エアロゾル粒子透過率測定データを、エアロゾル粒子の放射能基準粒度分布はカスケードインパクト各段の放射能測定データを入力データとして数値シミュ

レーションを行なった。なお、このシミュレーションにおける計算範囲は、 $0.001\text{--}10\mu\text{m}$  であり、この間をまず対数目盛りで80等分 (粒子径1桁当り20等分) し、各分割粒子径範囲毎に数値積分計算誤差が $0.01\%$ 以下になるか、あるいは、キザミ幅改変回数が100以上になるまで計算を続行した。

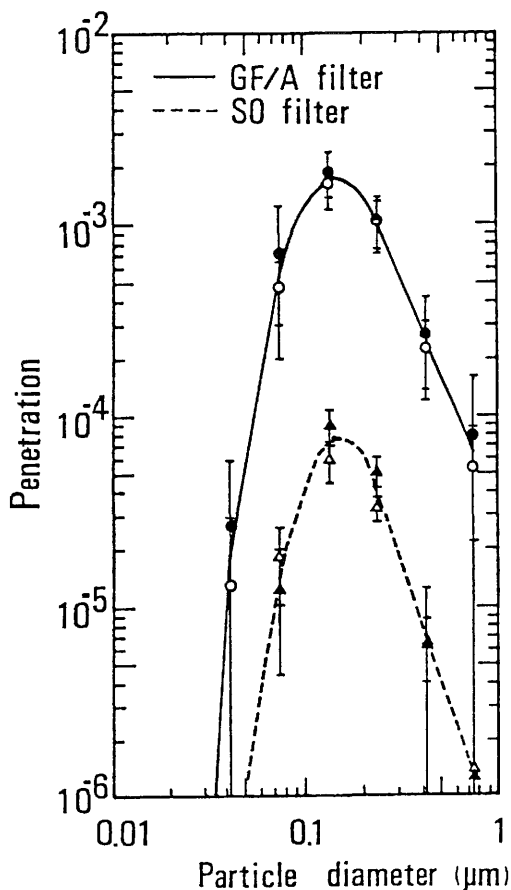


図4 Whatman GF/A ろ紙と HEPA (SO 型) フィルタ紙の透過率曲線

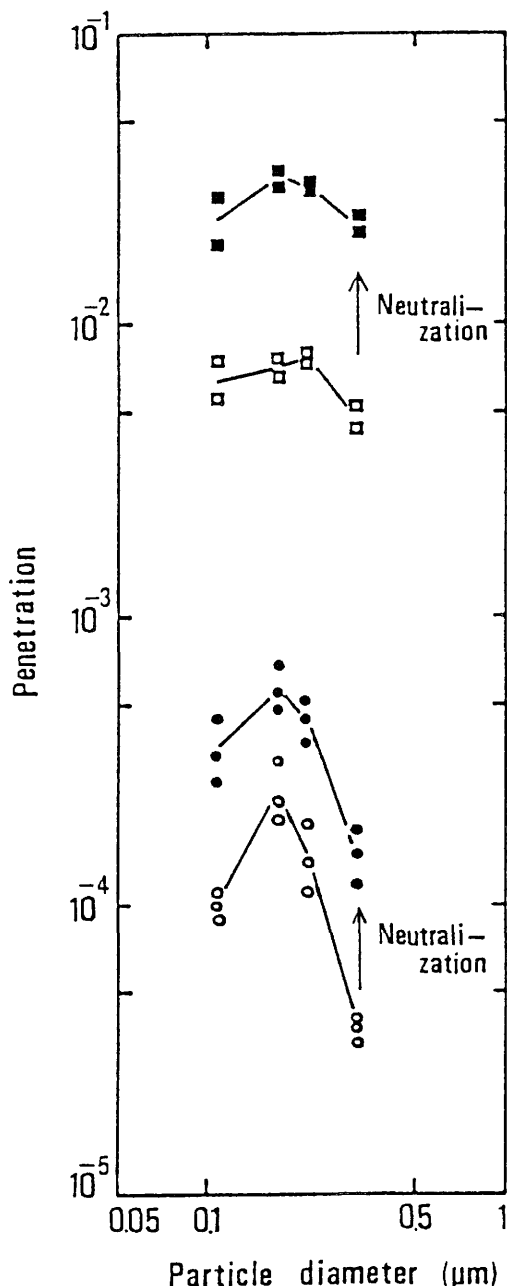


図5 中性能フィルタと HEPA フィルタのラテックス粒子に対する透過率の静電気中和の効果

### 3. 結果

#### a. 排気フィルタの捕集性能

Whatman GF/A ろ紙と HEPA フィルタ素材ろ紙の DOP エアロゾルに対する粒子径別透過率、すなわち透過率曲線の測定結果を図 4 に示す。2つの曲線は共に0.10から0.18 $\mu\text{m}$ の間にピーク

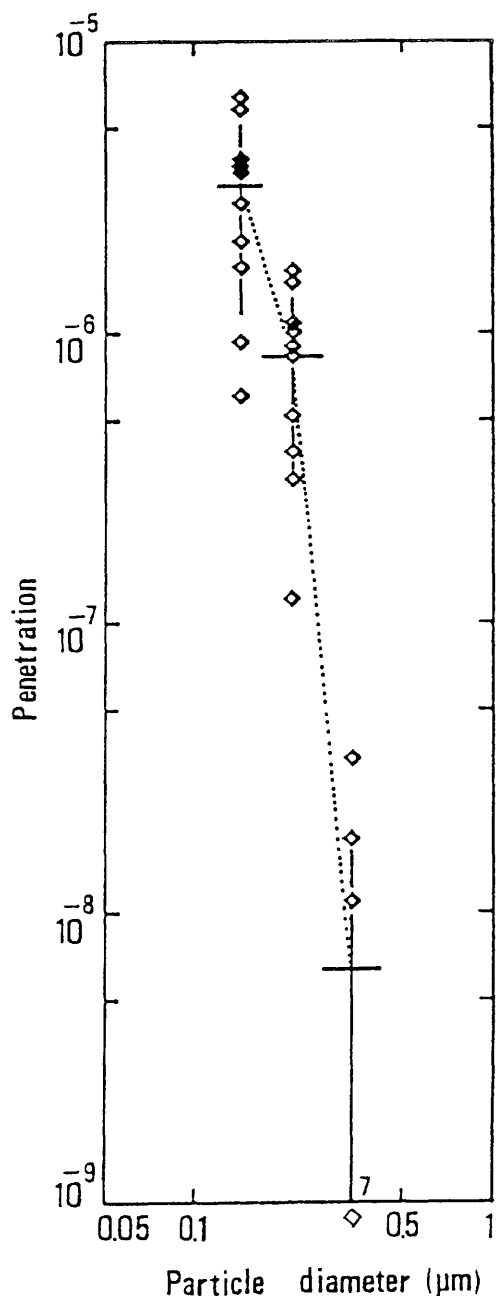


図6 ULPA フィルタの素材ろ紙の透過率曲線

があり、1桁程度の捕集性能の差を示した。また、大気塵を用いて同様の測定を行なったところ、ほぼ同じ曲線が得られ、DOP エアロゾル粒子と大気塵との間に、フィルタ捕集に関して大きな差の内ことが認められた。さらに、HEPA フィルタの性能評価基準として採用されている0.3 $\mu\text{m}$ 粒子の透過率は、最透過粒子径での透過率より1/10程度低い値を示した。

エアフィルタの粒子捕集得性に対する粒子の荷電の影響を標準ラテックス粒子を用いて調べた結果を図5に示す。 $^{85}\text{Kr}$ のベータ線源によって中和処理すると透過率は2-4倍高くなり、明らかに静電気の影響のあることが認められた。また、この透過率の上昇は粒子径に依存せず、最透過粒

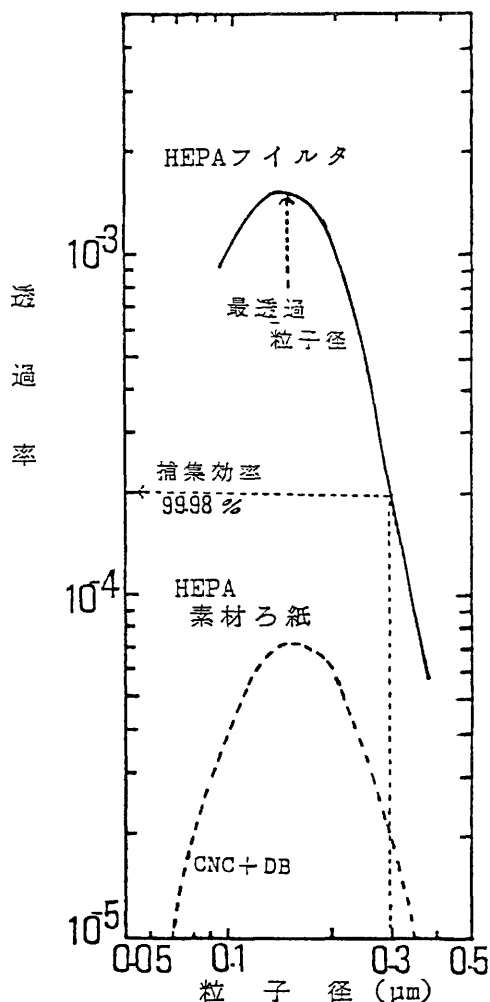


図7 排気フィルタ設備 (HEPA) および素材ろ紙の透過率曲線

子径も変化しなかった。

図6に、ULPA フィルタの素材ろ紙の透過率曲線の測定結果を示す。HEPA フィルタに比べ、2桁程度捕集性能の高いことが認められた。ULPA フィルタは HEPA フィルタより若干高い値を示したが、総じて素材の性能は向上していると認められた。

排気フィルタの素材ろ紙の捕集性能と製品となった排気フィルタ (610×610×290mm、30m³/H) の透過率曲線の測定結果を図7に示す。フィルタの種類は HEPA フィルタである。曲線が示す通り、最透過粒子径は変化せず、製品となった排気フィルタの透過率は約1桁高い値を示した。また、製品となった中性能フィルタを用いて2段フィルタの透過率曲線を測定した。その結果を図8に示す。同一の捕集性能を示す2つの中性能フィルタを直列2段に使用した場合、2段フィルタの粒子径別の効率は、2つのフィルタの効率の積に等しくなり、後段のフィルタの性能が低下する現象は見られなかった。

#### b. 捕集効率と除染係数の相関性の解析

エアフィルタの粒子径別の透過率のデータを両対数グラフ上にプロットしてみると、その透過率対粒子径の曲線の形状はかなり放物線に近い。本研究では、数値計算を容易にするため実験データを両対数グラフ上で放物線近似した。用いた実験データは最近報告された HEPA フィルタのデータ (日本空気清浄協会) である。実験データから求めた HEPA フィルタのエアロゾル粒子透過率近似曲線の方程式は、次式で与えられた。

$$Y = -8.00 \cdot (X + 0.872)^2 - 3.77$$

$$X = \log (d_p)$$

$$Y = \log (P)$$

ただし、ここでエアロゾル粒子径  $d_p$  は  $\mu\text{m}$  単位、粒子透過率  $P$  は無次元である。この透過率近似曲線から最大透過率とその時の粒子径、すなわち最透過粒子径とを求めると、 $1.68 \times 10^{-4}$ 、 $0.134 \mu\text{m}$  であった。

次に、これだけの性能を有する HEPA フィルタに対して、各種の粒度分布を持つ放射性エアロゾルを想定し、そのときの除染係数  $DF$  を数値計算でシミュレートした。その結果を図9に示す。フィルタの除染係数  $DF$  は、捕集対象であるエアロゾル粒子の性状、中央径と分散によって大きく変化することがこの図からわかる。また、捕集対象エアロゾル粒子の中央径が最透過粒子径から

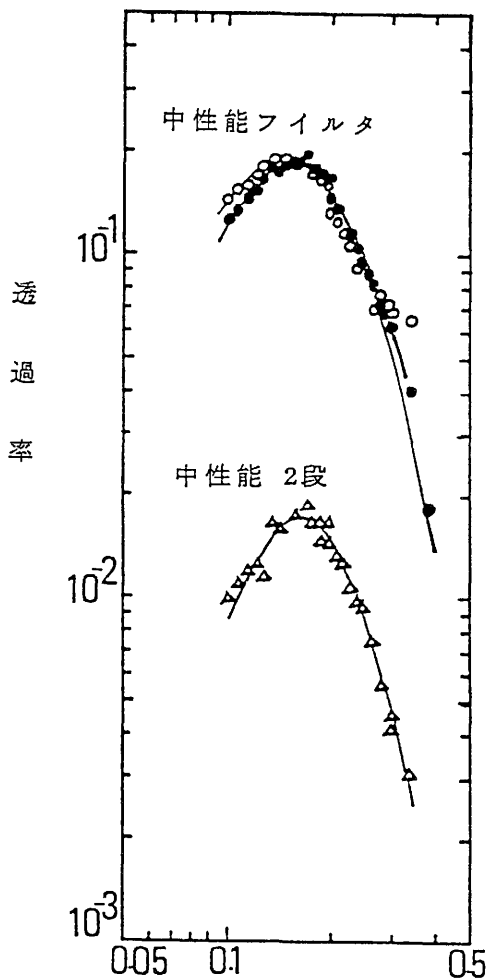


図8 中性能フィルタ単段および2段の透過率曲線

離れるほど  $DF$  は大きくなる。さらに、幾何標準偏差が大きいほど  $DF$  の中央径依存性は弱くなることがわかる。

#### c. $^{198}\text{Au}$ エアロゾルによる除染係数評価法の検証

まず、HE-40T フィルタの基礎特性データとしての透過率曲線を得るため、DOP エアロゾル粒子に対する粒子径別透過率値から最小2乗近似により近似透過率曲線を求めた。この近似曲線は、次式で表わされた。

$$Y = -2.24896X^2 - 4.12306X - 2.70523$$

$$X = \log (P)$$

$$Y = \log (d_p)$$

ここで、 $P$  は粒子径  $d_p$  のエアロゾル粒子に対する透過率、 $d_p$  はエアロゾル粒子径 ( $\mu\text{m}$ ) で

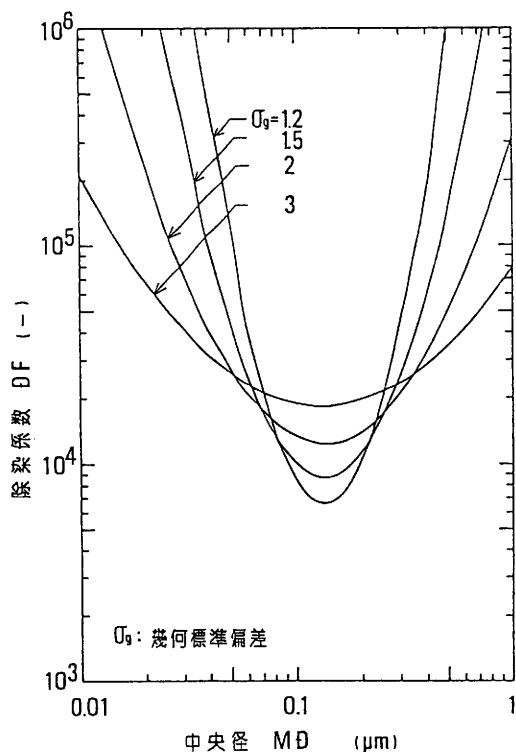


図9 数値計算で得られた中央径 (MD) と除染係数 DF の関係

ある。近似透過率曲線から求めた最透過粒子径は、 $0.121\mu\text{m}$ 、最大透過率は0.153であった。放射能除染係数 DF 測定に使用した直列3段の HE-40T フィルタ各段の透過率曲線は厳密には同一ではないが、本数値シミュレーションでは同一として扱った。

一方、 $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子の粒度分布については、カスケードイクバクタにより放射能基準中央径 AMAD が $1.2\mu\text{m}$ 、幾何標準偏差が2.0と実測された。この AMAD は、粒子形成メカニズムから考えて、体積基準中央径 VMD と等しくなると考えられた。

このような条件下で数値シミュレーションを実行すると、 $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子に対する直列3段の HE-40T フィルタの DF は、1段目の  $DF=11.7$ 、2段目の  $DF=20.0$ 、3段目の  $DF=12.0$  となった。この数値シミュレーション結果を実験値と比較したところ、図10に示すように両者はよく一致した。

#### 4. 討 論

素材ろ紙によるエアフィルタのエアロゾル粒子

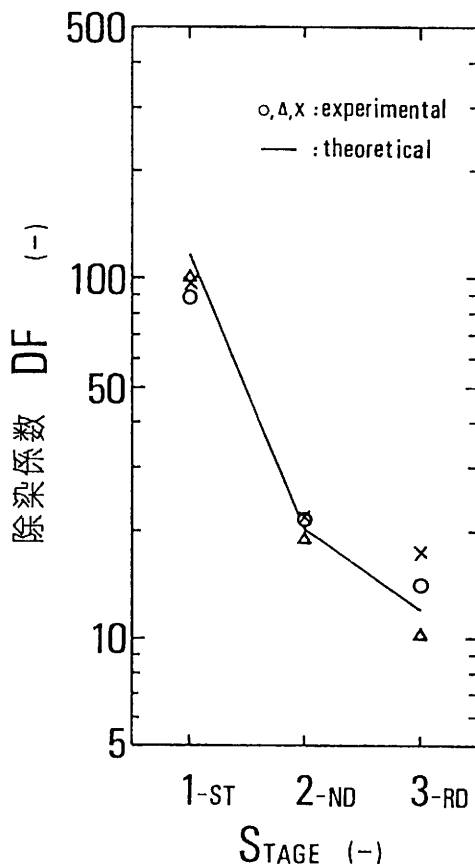


図10 HE-40T 3段フィルタの除染係数の計算値と実測値

に対する捕集特性を調べた結果、従来の知見と異なる多くの点が明らかとなった。その1つは、最も透過しやすい粒子径は $0.3\mu\text{m}$ ではなく、 $0.10-0.18\mu\text{m}$ の間にあり、その透過率は $0.3\mu\text{m}$ 粒子に比べ、約1桁高い値を示した。このことは、現行の HEPA フィルタの性能評価基準粒子径を見直す必要性を示唆している。

また、エアロゾル粒子が重荷を帯びていると透過率は低く、つまり捕集され易いことが実測により明らかになった。実際の放射性エアロゾル粒子が荷電しているか否かは、通常不明である。従って、エアフィルタの性能試験を行なう場合、試験エアロゾルの荷電により、実際の捕集効率より高く評価してしまう可能性のあることに留意する必要がある。

さらに、排気フィルタの性能評価方法は HEPA フィルタについてのみ検討されているのが現状であるが、近年新しい ULPA フィルタが

市販されるようになり、その性能が明らかに HEPA フィルタより向上していることが実験的に確認された。従って、従来法とは異なる、さらに高い捕集効率を確認できる性能評価方法を検討することが必要になると考えられる。

これらの知見はフィルタ素材ろ紙を用いた実験で明らかになったことであるが、素材ろ紙を組み込んだ、製品となったフィルタを実際の排気フィルタ設備に装着、使用した場合の捕集性能は、素材ろ紙のそれとは大きく異なる。このことは図 7 の結果に明らかであり、排気フィルタのピンホール、バイパスリークなど、素材ろ紙の性能を低下させると考えられる要因は多い。従って、排気フィルタの性能試験における現場試験の重要性は今後とも低くならないと考えられる。

一方、原子力施設で見られる多段フィルタの、後段フィルタの性能が低下しないという実験結果も、従来と異なる新しい知見である。粒子径別に見ると、各段のフィルタは同一の性能を有するということである。しかし、粒子径別捕集効率と放射能除染係数 DF とは同一ではない。フィルタを通過すると、エアロゾル分布が変化し、透過率の高い大きさの粒子径の割合が増加するため、粒子径別捕集効率は各段とも同一であっても、DF は低下すると考えられる。

以上の知見を基礎とし、粒子径別透過率（透過率曲線）と DF とを定量的に関係づける理論的試みを行なった。その結果、フィルタの除染係数は、エアロゾルの基本的性状である中央径と分散（幾何標準偏差）によって、大きく変化することを図 9 で示した。このことが意味することは保健物理学的にも重要で、フィルタの捕集性能が一定であったとしても、そこで期待できる DF は一律には決まらないということである。ただ、唯一明確にいえることは DF の最小値だけはフィルタの固有であることである。

さらに、この粒子径別透過率と除染係数との関係を明らかにする理論を、実際の放射性エアロゾルを用いて検証した。一般に、放射性エアロゾルの放射能は、粒子個数に比例するケースと、表面積に比例するケースおよび体積に比例するケースの 3 通りが考えられる。今回用いた  $^{198}\text{Au}$  エアロゾルは、放射能がエアロゾル粒子の体積（質量）に比例するケースであり、このような場合に限定されるが、実験結果は、理論の妥当性を示したと思われる。

## 5. 結 論

排気フィルタとして使用される HEPA フィルタの素材ろ紙及び製品フィルタの最透過粒子径は  $0.10\text{--}0.18\mu\text{m}$  の間にあり、 $0.3\mu\text{m}$  粒子に比べ、その透過率は約 1 桁高い。また粒子が電荷を帯びている場合には透過率は低く観測されるため、フィルタの性能評価の際には注意を要する。

近年市販されるようになった ULPA フィルタの素材ろ紙は、HEPA フィルタの素材ろ紙より捕集性能の向上していることが確認された。排気フィルタ設備の放射性エアロゾル捕集性能についても性能向上が期待でき、より感度の高い性能評価方法の必要性が予想される。

多段に用いられたフィルタの捕集効率は、粒子径別透過率で見ると、後段の性能が低下することではなく、総合的な捕集効率は、各段のフィルタの積として評価し得る。

フィルタの捕集効率と放射能除染係数 DF と同一ではなく DF は対象エアロゾルの中央径、分散により大きく変化する。エアロゾルの中央径、分散が不明でも、最大透過率の逆数として定まる DF の最小値が存在し、この値はエアロゾル分布に依らない、そのフィルタ固有の値である。

### 〔研究発表〕

- 1) Yamada, Y., Miyamoto, K., Mori, T. and Koizumi, A. : Penetration of submicron aerosols through high-efficiency air filters. *Health Phys.*, **46**, 543–547, 1984.
- 2) 山田裕司、宮本勝宏、小泉 彰、: HEPA フィルタの捕集効率と除染係数・保健物理、**21**, 237–244, 1986.
- 3) 山田裕司、宮本勝宏、高橋千太郎、小泉 彰、:  $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子に対するエアフィルタの除染係数・保健物理、**22**, 403–410, 1987.
- 4) Yamada, Y., Miyamoto, K., Mori, T. and Koizumi, A. : A comparison of different laser aerosol spectrometers for measurement of particle penetration through a medium efficiency air filter. *Hoken Butsuri*, **19**, 141–146, 1984.
- 5) Yamada, Y., Miyamoto, K. and Koizumi, A. : Size determination of latex particles by electron microscopy. *Aerosol Sci. Technol.*, **4**, 227–232, 1985.

## 5. 放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研究

山田 裕司, 久保田 善久, 福田 俊, 小木曾 洋一,  
飯田 治三, 松岡 理 (内部被ばく研究部)

### Methodological Studies on the Inhalation of Radioactive Aerosols

Yuji Yamada, Yoshihisa Kubota, Satoshi Fukuda, Yoichi Oghiso Haruzo Iida  
and Osamu Matsuoka  
Division of Comparative Radiotoxicology

Inhalation exposure of radioactive aerosols for dose pattern or effects studies requires consideration of many factors including (1) aerosol generation and treatment to provide the desired aerosol particles, (2) exposure system to provide the uniformity of inhaled aerosol particles and to minimize the external contamination on animal, and (3) safety system of the exhaust filter and its operating and control system.

Prior to design of inhalation exposure system, we tried to examine a feasibility of whole-body plethysmography as respiratory measurement method during exposure. Its accuracy was confirmed for our designed exposure container. The practical availability was also shown in estimating initial particle deposition rate in the respiratory tract.

In this project, two inhalation exposure systems for small rodents and dogs were developed. These systems are housed in a large glove-box with double-cover doors. The small rodents exposure system is capable

of simultaneous exposure of up to 20 rodents. Each animal is held in special designed container for exposure such that only its nose encounters the radioactive aerosols. The container also serves as a whole-body plethysmograph. The exposure system was tested by using Au-198 aerosol particles with AMAD (Activity Median Aerodynamic Diameter) of  $1.2\mu\text{m}$  and  $\sigma_g$  (Geometric Standard Deviation) of 2.0. Ten Wistar rats were exposed for 1 hour. All rats were sacrificed immediately after the exposure and external contamination on each rat was measured. But no activity was detected except. At the same time, aerosol sampling was made during exposure at several positions in the glove-box. Statistically significant activity was not counted for all sampling filter. Test of aerosol generation and aerosol control system including emergency circuit was also made and satisfactory results were obtained.

#### 1. 緒言

吸入による放射性物質の体内への取り込みは、現実にも起こりうる経路の中で最も重要な経路の1つであり、内部被ばく影響研究、特にアルファ放射体の内部被ばく影響研究を遂行する上で重要

である。しかし、注射あるいは経口投与法に比べ、吸入投与法は、特殊な技術および専用の設備・機器を必要とし、さらに、実験の安全確保にも十分な考慮が必要になるなど、実験の遂行は容易ではない。このような理由から、放射性エアロゾルの吸入実験例は余り多くない。特に、国内では、非

常に限られており、早急に実験法の確立および実験装置の整備することが望まれている。また、吸入実験においては、他の注射投与実験などと異なり、投与量を正確に知ることは非常に難しい。この原因の1つには、吸入実験中の動物の呼吸を測定することの難しさがあった。

本研究では、放射性物質をエアロゾル粒子化し、マウス・ラットなどの小動物からイヌのような中型動物までの各種実験動物に、安全・確実に吸入投与する技術の確立および吸入実験装置の開発を試みた。また、これと同時に、実験の精度向上のため、吸入エアロゾル粒子の精密測定、吸入中動物の呼吸機能測定についても検討した。

2. 研究方法

a. 非放射性エアロゾル吸入実験

本実験は、吸入投与中動物の呼吸測定法の実証およびエアロゾル吸入量の算出を目的に計画されたものである。吸入量とは、吸入中の動物の呼吸量と吸入エアロゾル濃度との積である。吸入中の動物の呼吸量を測定する際、動物の呼吸及び吸入エアロゾルの挙動に影響を与える様な測定法、例えば、動物の鼻口部に種々の呼吸センサを装着す

るような方法は適切ではない。そこで、動物の呼吸・吸気を直接測定するのではなく、動物の呼吸運動によって生ずる体容積変化を呼吸量として捉えられるボディプレシスモグラフ法 (Body Plethysmography) が小動物に対しては最適であると考えた。このボディプレシスモグラフ法については、既に前特研においてその有効性を確認している。ここでは、プロトタイプの吸入実験装置を使用しラテックス粒子の吸入を試みた実用試験について述べる。図1に、実験の概要を示す。プレシスモグラフボックスを兼ねた動物固定ホルダに、当所生産ウイスタ系ラット (8-15週齢、体重250-350 g) 10匹をネブタール麻酔下でセットし、1あるいは2  $\mu$ m径のラテックス粒子 (ダウケミカル社) を1時間鼻部曝露した。曝露チャンバ内のエアロゾル濃度は、エアロゾルスペクトロメータ (PMS 社) 及び同質量モニタ (カノマックス社) で測定した。動物の呼吸は、スイッチングバルブを介して経時的に恒圧型ボディプレシスモグラフ法でモニタした。各ラットの吸入粒子数は、ラットの呼吸量と同一時刻に測定されたエアロゾル粒子濃度の積から算出した。吸入終了後、一定時間毎にラットを放血と殺し、摘出肺の右葉

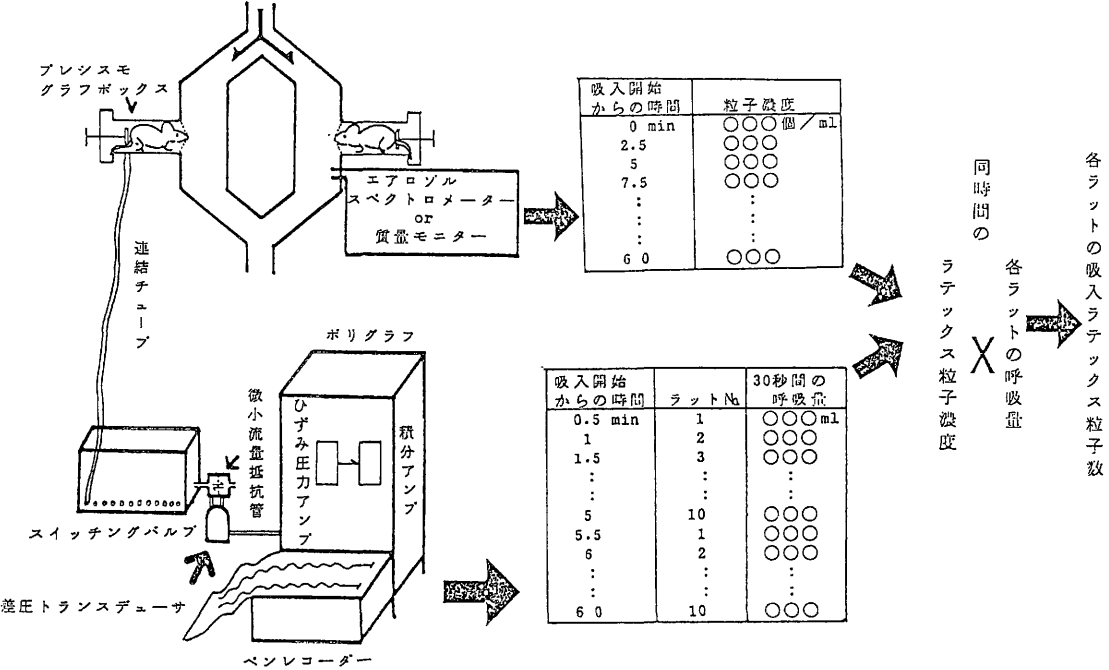


図1 ラテックス粒子吸入実験における吸入粒子数の算定方法

を肺沈着粒子数の算定に、左葉を肺マクロファージによって貪食された粒子数の算定に使用した。具体的には、肺右葉を細切し、20-30mLの8%KOH, 70% アルコール液に浮遊、室温にて3日間放置で肺組織を消化後、液中の粒子を血球計算盤にて計数し肺沈着粒子数とした。一方、肺左葉には、気管支にカテーテルを挿入してリン酸緩衝液で洗浄、回収した細胞を塗抹・染色後、顕微鏡観察により肺マクロファージに貪食された粒子数を算定した。ここでは、肺1g当りの沈着粒子数で、100個の肺マクロファージに貪食された粒子数を割った値と定義する。

#### b. 放射性エアロゾル吸入実験装置の開発

放射性物質をエアロゾル粒子化して実験に使用するという放射性エアロゾル吸入実験は、潜在的に汚染の危険度が高い実験であるため、装置の開発段階から安全性を最優先に考えた。以下、装置の概略を述べる。放射能空気汚染を防止するため、実験装置は閉鎖回路系とし、回路内を負圧に維持する機構を設けた。そして、さらに装置全体を図2に示すようなグローブボックス作業では、作業の迅速性・自由度の点で問題があるため、装置の運転・制御は、隣接の制御室からの遠隔制御方法を採用した。制御室には、装置運転を安全確実に行うため、装置各部からの情報（流量、圧力、温度、濃度ほか、各種機器の運転状況）を受け取り、表示すると共に、装置を自動コントロールする機能、実験データを収集・解析・記録・保存する機能、データが異常時には警報を発する機能などを設け

た。なお、制御室と実験室との間はガラス窓で仕切られており、視覚上の対策も構じられている。つぎに、小動物用の吸入実験装置を例に、装置各部について具体的に述べる。吸入実験装置本体は、図2に示すように、基本的には、エアロゾル発生部、加熱・調整等の前処理部、吸入曝露部および後処理用の排エアロゾル処理部で構成されている。装置全体の流れ図を図3に示す。

##### 1) エアロゾル発生部

エアロゾル原料物質は、水溶液または懸濁液の形で供給されるため、エアロゾル発生器としては、いわゆる霧吹きタイプのネブライザを試作した。発生させたエアロゾルの濃度安定性をよくするため、試料原液はシリンジポンプにより定量供給した。送液量率が可変型のシリンジポンプと3台並列出力のネブライザとを組み合わせることにより、広範囲な濃度設定を可能とした。

##### 2) 加熱・調整部

このエアロゾル前処理部には、必要に応じて利用可能な機器が in-line でいくつか組み込まれている。化学中和器は、気相化学反応による中和を行なうもので、 $\text{NH}_3$  ガスが配管されている。静電中和器には、エアロゾル粒子の異常帯電を取り除き、ボルツマン平衡荷電分布とするための放射線源  $^{85}\text{Kr}$  が2mCi 内蔵されている。加熱部は、エアロゾル粒子を酸化物化するためのもので、均質酸化を促進するために2段階の加熱工程がある。本加熱では、短時間で1000℃以上の温度に昇温あるいは常温に降温する必要があったため、赤

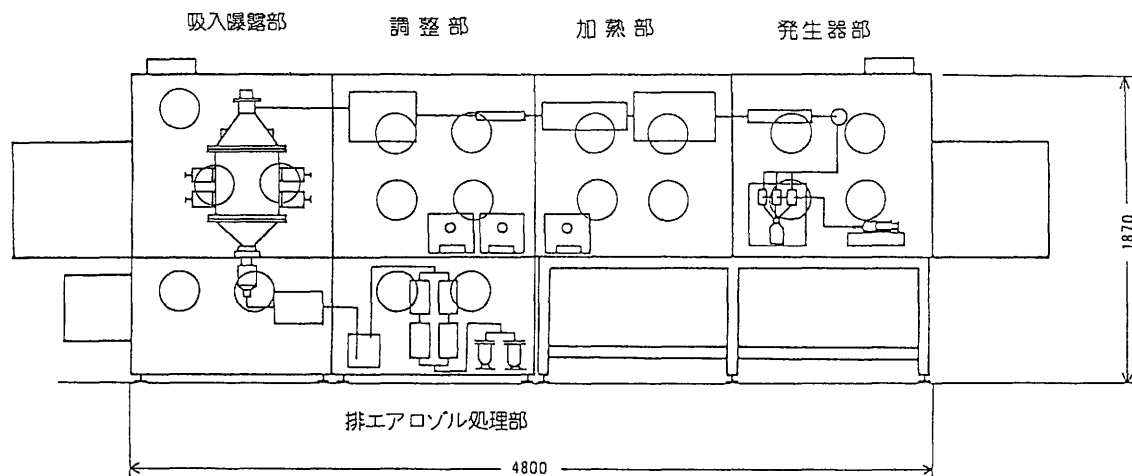


図2 小動物用吸入実験装置の概略

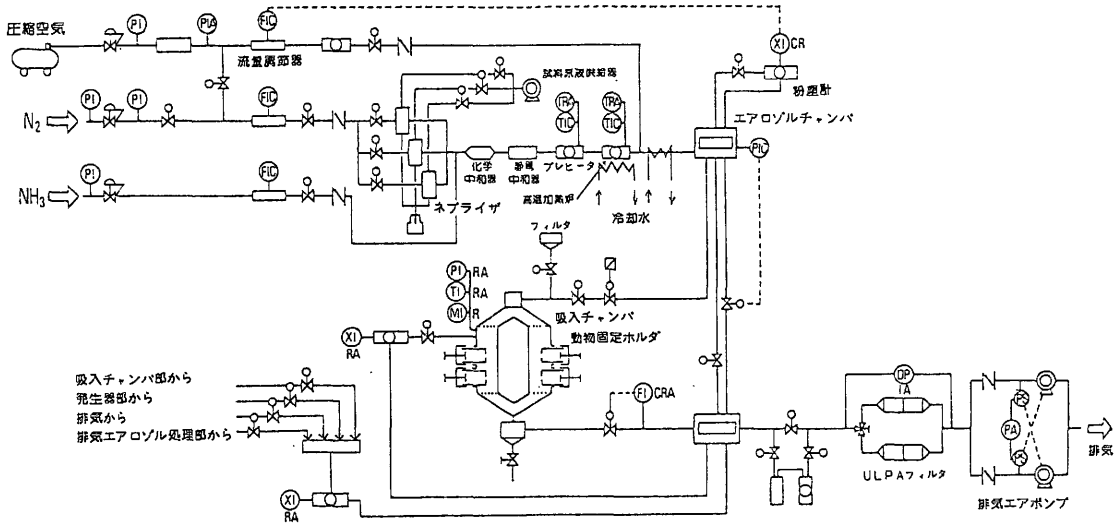


図3 小動物用吸入実験装置のシステムフロー図

外線集光方式のイメージ炉を採用した。調整部では、吸入エアロゾル濃度を一定に保つため、フィードバック回路を設けた。これは、エアロゾル濃度を光散乱式の粉塵計により絶えずモニタ監視しながら、濃度設定上下限でエアロゾル発生器をON-OFFコントロールするものである。また、これと同時に吸入曝露チャンバ部を流れる空気量を一定に、しかも、その圧力をグローブボックス内雰囲気よりも負圧に維持するため、センサと組み合わせた電動バルブコントロール型フローシステムを構築した。

### 3) 吸入曝露部

動物へのエアロゾル粒子の吸入曝露方法には、大きく分けて全身曝露法と鼻部あるいは頭部だけという局部曝露法とがある。吸入エアロゾルが放射性の場合、初期肺沈着量を算出するために、通常、体外放射線計測が行われるが、全身曝露では、動物体表面汚染のため正確な測定が出来ない。このため、曝露法としては、曝露される面積が小さい局部曝露が望ましい。また、初期肺沈着量と共に重要なパラメータである初期肺沈着率を求めるためには、吸入時の動物の呼吸を知る必要がある。これらを考慮した結果、曝露法としては鼻部曝露法を選択し、呼吸機能測定を可能とするため図4に示すように動物固定ホルダをボディプレシスモグラフボックス化した。小動物用の吸入実験装置

では、最大20匹まで同時曝露が可能であり、呼吸測定もこれに対応するため図5に示すようなミリ秒単位の時分割マルチプレクサ方式による測定システムを開発した。

### 4) 排エアロゾル処理部

動物に吸入されなかったエアロゾルを捕集するためフィルタ法による排エアロゾル処理部を設けた。フィルタには、最近、開発市販されるようになったULPA (Ultra Low Penetration Air) と呼ばれる超高性能エアフィルタを組み込んだ直列2段式フィルタシステムを採用した。ただし、実際のシステムでは、フィルタの急激な目詰まりあるいは何らかの原因によりフィルタの健全性が損なわれた場合にも対応できるようにするため、この直列2段フィルタを並列に配置し、何れのフィルタシステムでも処理できるように構じた。また、排気エアポンプについても、同様な考え方から2台並列に配置し、さらに自動切り替え回路を設けた。以上が、本吸入実験装置の概要である。

続いて、短寿命放射性核種 $^{198}\text{Au}$ を用いて行なわれた装置特性試験について述べる。 $^{198}\text{Au}$ エアロゾル粒子を発生させるため、まず、 $^{198}\text{Au}$ コロイド溶液を次のような方法で作製した。アマージム社製の塩化金酸 ( $\text{H}^{198}\text{AuCl}_4$ , 1.95mCi/mL, 0.12mg Au/mL) 0.4mL を70℃で乾燥させたのち、蒸留水 (50mL)、担体としての非放射性塩

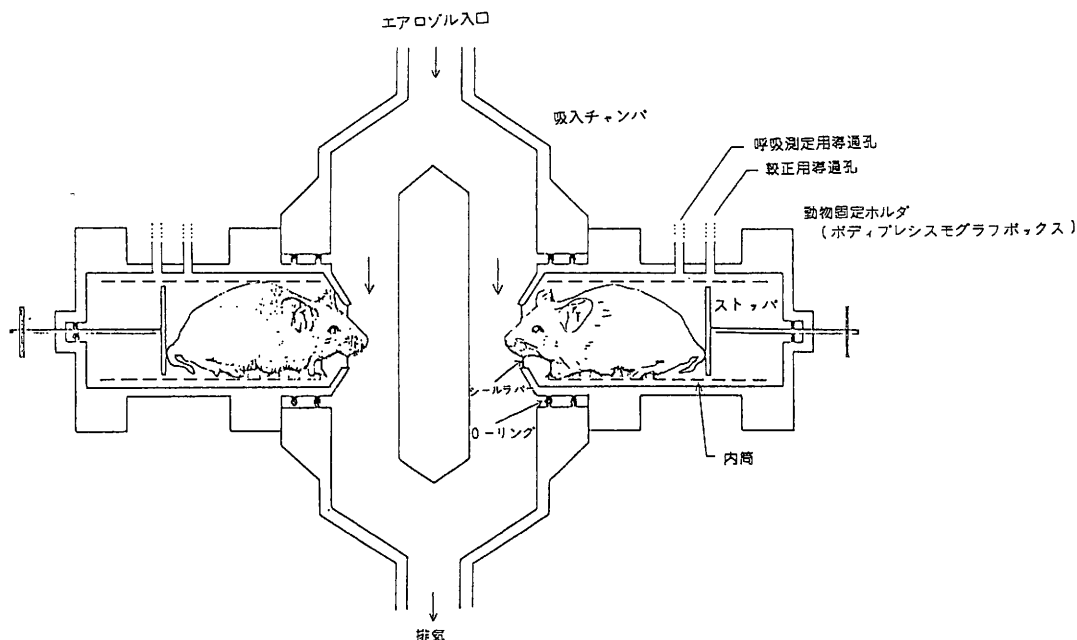


図4 小動物用の動物固定ホルダの構造

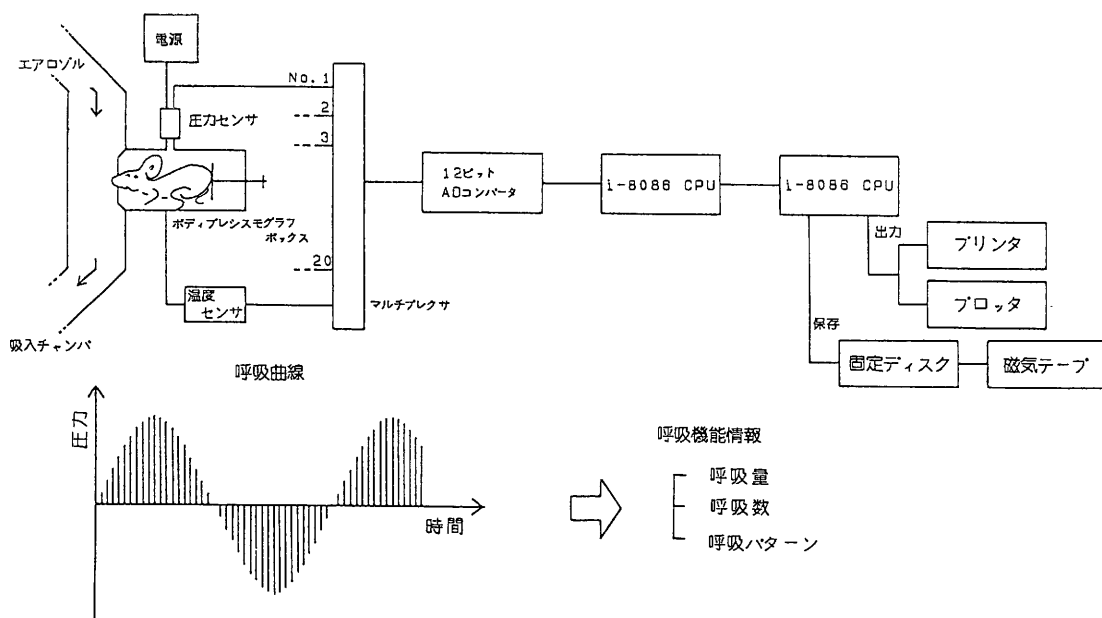


図5 多数頭用の吸入中動物の呼吸機能測定システムの概略

化金酸 (0.5mL, 1wt%) およびクエン酸 3 ナトリウム・2 水和物 (0.5mL, 1wt%) を加えて沸騰させコロイド化した。生成した  $^{198}\text{Au}$  コロイドは、ゼラチン (100mg) で安定化した。こうして作製した  $^{198}\text{Au}$  コロイド溶液 (50mL) を試料原液とし、ネブライザ 3 台でエアロゾル化した。このときのネブライザへの送液率は、0.59mL/min、送気率は 1 台当り 2.5L/min であった。 $^{198}\text{Au}$  エアロゾルの放射能濃度は、フィルタ法により求めた。放射能基準の粒子径分布測定には、CM 社製 PC-2 型カスケードインパクトを用いた。サンプリング流量率は 240mL/min であり、このときインパクト各段の 50% カットオフ粒子径は 1 段目の  $35.4\mu\text{m}$  から最終 10 段目の  $0.0707\mu\text{m}$  であった。ただし、これらの粒子径は粒子密度が  $1\text{ g/cm}^3$  と仮定して計算された。カスケードインパクト各段に捕集された  $^{198}\text{Au}$  エアロゾルの放射能測定には、GM カウンタ (アロカ、GP-14V 型) を用いた。また、これらと並行して、エアロゾルの粒子形状を調べるためサーマルプレシピテータ (柴田科学、L-2 型) を用いてエアロゾルサンプリングを行ない、透過型電子顕微鏡で観察した。動物については、ウイスタ系ラット 10 匹 (体重: 350-400 g) にネブタール麻酔を施した後、吸入用の動物固定ホルダに入れ 1 時間の鼻部曝露を行なった。吸入後、鼻部およびその他の体表面について、スメアあるいは全身計測により体表面付着放射エネルギーを算出した。この他、装置の排気フィルタの有効性・装置安全性を確認するため、グローブボックス内各部および装置排気口においてもフィルタサンプリングを行ない漏洩放射能を調べた。

### 3. 結果および討論

#### a. 非放射性エアロゾル吸入実験

吸入終了後の時間経過とラテックス粒子の肺沈着率 (吸入粒子数に対する肺沈着粒子数の割合) の関係を図 6 に示す。1  $\mu\text{m}$  ラテックス粒子は、吸入後 0-6 時間の間に急速にクリアランスされるが、2  $\mu\text{m}$  粒子では、このような傾向は認められなかった。肺沈着率は、全ての時間を通じて 1  $\mu\text{m}$  粒子の方が高かった。特に、初期沈着率、すなわち、吸入 0 時間後では、両者の間に大きな差が認められた。粒子径 1  $\mu\text{m}$  と 2  $\mu\text{m}$  とでは、肺沈着率に差がないという報告もあるが、本実験結果との相違が何に起因するものか明らかではない。また、気管支纖毛運動による肺からの上行性

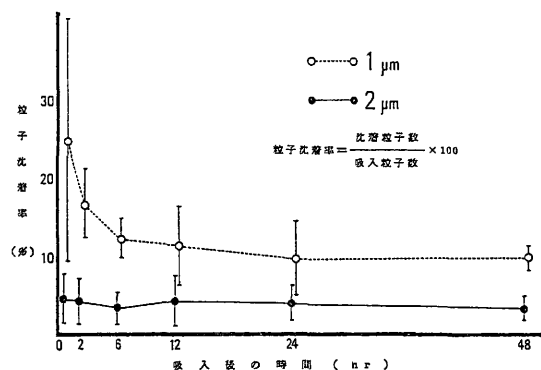


図 6 ラテックス粒子の肺沈着率

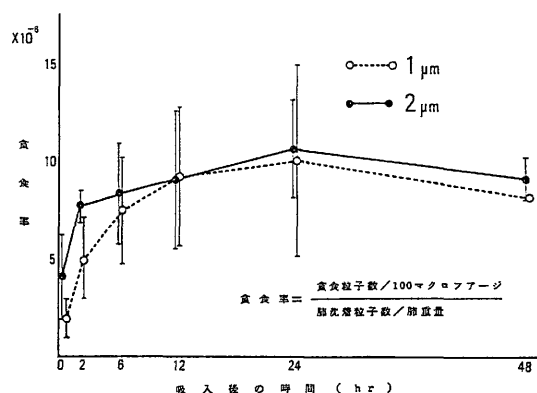


図 7 肺マクロファージのラテックス粒子貪食率の時間経過

クリアランスは、吸入後 24 時間以内に行われると考えられており、本実験でも、1  $\mu\text{m}$ 、2  $\mu\text{m}$  粒子共に 24 時間以降の肺沈着率の大きな減少は認められなかった。

つぎに、吸入後の肺マクロファージによる貪食率を図 7 に示す。吸入後 0 時間で、貪食率が 0 でないことは、吸入中に沈着粒子の一部が既に貪食されていたことを示す。1  $\mu\text{m}$ 、2  $\mu\text{m}$  粒子共に、吸入後 12 時間以上経過すると貪食率はほぼプラトーに達した。また、このときの値は両者ほぼ同一であった。しかしながら、吸入後 12 時間までは、1  $\mu\text{m}$  粒子の貪食率は、2  $\mu\text{m}$  粒子のそれより低い値を示した。例えば、吸入後 0 時間では、2  $\mu\text{m}$  粒子の貪食率は 1  $\mu\text{m}$  粒子の約 2 倍、2 時間では約 1.5 倍であった。ただし、吸入後の肺沈着粒子数を考える場合には、沈着部位とその沈着部位からのクリアランスも考慮しなければならない。

図6の肺沈着率データからは、 $2\mu\text{m}$ 粒子では肺からのクリアランスがほとんど認められないのに対し、 $1\mu\text{m}$ 粒子は、その初期沈着粒子数の約60%が吸入後24時間以内に肺から除去されていることが明らかである。 $1\mu\text{m}$ 粒子の場合、肺マクロファージによる貪食を受けずに上行性にクリアランスされる沈着粒子が、吸入後短時間では大きな比率を占める。このため肺マクロファージの貪食率は $2\mu\text{m}$ 粒子と比較して相対的に低い値となることが示唆された。事実、沈着粒子の中で、上行性にクリアランスされる粒子の影響を除去した場合の肺マクロファージ貪食率は、吸入後短時間でも、 $1\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ 粒子の間で非常に一致を示し、 $1\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ 粒子とが同一の貪食速度で肺マクロファージに貪食されていることが示唆された。

b. 放射性エアロゾル吸入実験装置の基礎特性  
小動物吸入実験装置の基礎時性を調べた結果の1例を図8に示す。これは、エアロゾル粒子の発生から停止までの一連の操作の中で得られたエアロゾル濃度測定の結果である。濃度安定化のためのコントロール回路をOFFにして、全く自由にエアロゾルを発生させるとかなり大きな濃度変動があるような場合でも、コントロール回路をONにすると、エアロゾルチャンバ内ではノコギリ歯型変動こそ残るが、平均濃度は安定する。さらに、吸入曝露チャンバ内では、このノコギリ歯も平滑

化されて、極めて安定した濃度が得られることが確かめられた。ただし、この方式の欠点として、発生エアロゾルを100%完全に吸入用として有効利用できないという問題がある。これは、濃度安定化および負圧維持のため、バイパス空気を流入させていることに起因するもので避けられない問題である。このエアロゾル発生部分について詳細に調べた結果図9に示す。エアロゾル濃度は、ネプライザに送る試料原液量の速度の依存して変化する。このとき吸入曝露チャンバ内のエアロゾル濃度は、その前段にあるエアロゾルチャンバ内のエアロゾル濃度に比例して変化する。このことは、ネプライザへの送液率を変えることにより簡単にエアロゾル濃度をコントロールできることを示している。吸入曝露チャンバへのエアロゾルの流出入特性については、図8に示すように、エアロゾル濃度半減化時間あるいは濃度倍加時間がいずれも2分以内とかなり短く、チャンバ内に空気の淀みが少なくスムーズな流れになっていることが示唆された。また、吸入曝露チャンバ内のエアロゾル濃度の空間分布も、そのバラツキが10%以内という値が得られた。これらは、チャンバの構造が2重円筒構造であること及びチャンバへのエアロゾル投入が円接線方向入射であることなどによるものと思われる。

つぎに、短寿命放射性核種 $^{198}\text{Au}$ を用いて行なわれた装置特性試験の結果について述べる。カス

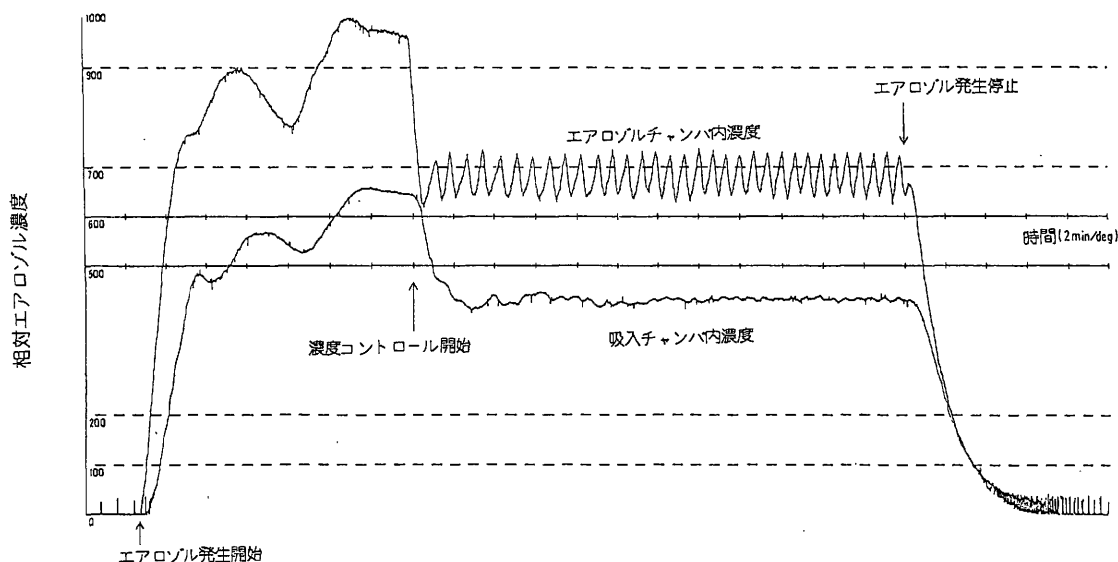


図8 小動物用吸入実験装置における吸入エアロゾルの発生および濃度コントロールの例

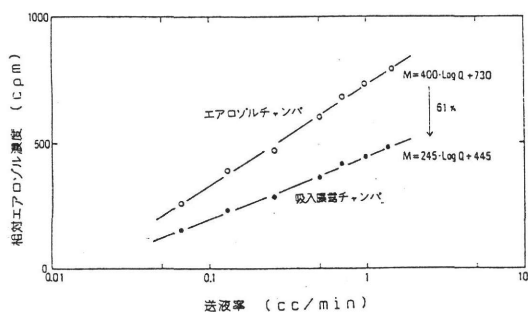


図9 エアロゾル発生器における試料原液の送液率とエアロゾル濃度との関係

ケードインパクトの各段に捕集された  $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子の放射測定から、放射能基準の粒度分布を求めたところ、放射能基準空気力学的中央径 AMAD (Activity Median Aerodynamic Diameter) =  $1.2\mu\text{m}$ 、幾何標準偏差  $\sigma_g = 2.0$  が得られた。このエアロゾル粒子の粒子形状は極めて球形に近かったが、1つ1つの粒子は全てが Au で構成されている均質粒子ではなく、図10に示すようなゼラチン・グルコース粒子の中に  $^{198}\text{Au}$  を含む Au コロイドが混入して出来た非均質粒子であることが電子顕微鏡観察から分かった。Au コロイドの大きさはおよそ  $20\text{nm}$  であった。この  $^{198}\text{Au}$  エアロゾル粒子をラットに鼻部曝露吸入させ、そのときの鼻部周辺およびその他の体表面汚染を調べたところ、動物固定ホルダの鼻部シールラバー部を境にして、曝露側であるラット鼻部では高濃度の放射能の沈着が認められたが、その外側部分では有意な放射能は検出されず鼻部シールラバーが有効に働き放射能の漏洩を防止していたことが確かめられた。また、吸入実験装置の排気口をはじめ、吸入用グローブボックス内の各所でも放射能の漏洩の有無が調べられたが、何れの場所においても有意な放射能は検出されず、排気フィルタが有効に働いていたことが実証された。

また、投入したエアロゾル発生試料原液の放射エネルギーに対する吸入曝露チャンバ内エアロゾル粒子の放射エネルギーの比、すなわち、有効エアロゾル化率であるが、 $^{198}\text{Au}$  エアロゾルの場合、わずか  $0.74\%$  であった。試料原液の約  $80\%$  がエアロゾル化せず、液体のまま廃ドレンに回収されている。これは、吸入エアロゾルの濃度を安定させるために、エアロゾル発生器へ試料原液を過剰に送っていることおよび試料原液を循環させて再利用していな

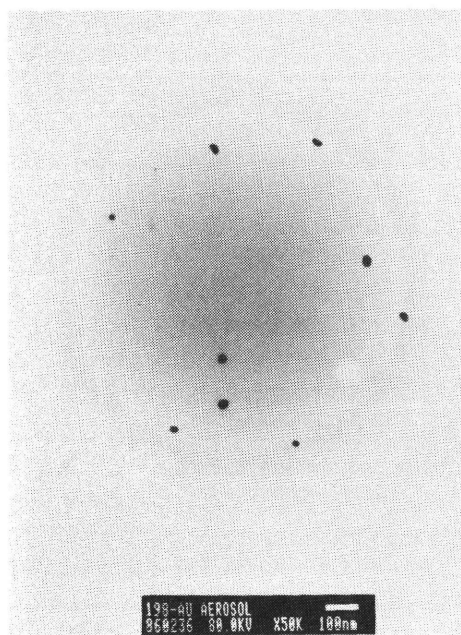


図10  $^{198}\text{Au}$  エアロゾルの電子顕微鏡写真

いことなどに起因していると考えられる。ただし、この有効エアロゾル化率は、試料原液の種類・状態あるいは発生条件等により変化するものであるため、実際には、その実験毎に評価しなければならない。

#### 4. 結 論

本特別研究において、放射性エアロゾルを実験動物に吸入投与するための吸入実験装置として、小動物用と中型動物用の2基が開発された。両者は、吸入曝露部分を除くと基本的には同一の構造である。

小動物用の吸入実験装置は、昭和60年度末に試作され、その後、非放射性・放射性エアロゾルによる装置試験を実施してきた。試作当初、問題のあった発生エアロゾル濃度の安定性についても、バイパス回路の増設あるいは制御システムソフトウェアの改善により満足しうる対吸入エアロゾル濃度の比、すなわち、有効エアロゾル効率という点では、 $1\%$ 弱という余り高くない値が得られ、改めて、吸入という投与法の効率の悪さを認識させられた。吸入中動物の呼吸測定についても、スイッチングバルブによる機械的な切り替えからマルチプレクサによる電氣的な切り替え方式へとよ

り多数頭同時測定化に向けて改良された。

一方、中型動物用の吸入実験装置は、昭和63年度末に完成したため、まだ十分に装置性能試験が実施されていない。主にイヌを対象とした本装置は、①多数頭同時曝露から単独曝露へ変更、②曝露チャンバ方式から鼻部マスク方式へ変更、③ボディプレシスモグラフ方式の呼吸測定から吸呼気分離による呼吸流速測定方式へ変更などの点で小動物と設計・仕様が異なっている。今後、本装置についてもその性能を詳細に検討評価する予定である。

#### 〔研究発表〕

- 1) 久保田善久、山田裕司、高橋千太郎、松岡理：ラット吸入実験における吸入量の算定。  
*Exp. Anim.*, **33**, 535-538, 1984.
- 2) Oghiso, Y., Yamada, Y., Kubota, Y. and Matsuoka O.: Pulmonary deposition and ef-

fects of inhaled silica particles after short-term exposures in the rat. *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 1-3, 1986.

- 3) Yamada, Y., Miyamoto, K. and Koizumi A.: Size determination of latex particles by electron microscopy. *Aerosol Sci. Technol.*, **4**, 227-232, 1985.
- 4) Yamada, Y., Miyamoto, K. and Koizumi, A.: Size measurements of latex particles by laser aerosol spectrometer. *Aerosol Sci. Technol.*, **5**, 377-384, 1986.
- 5) Kubota, Y., Takahashi, S., Sato, H., Yamada, Y. and Matsuoka, O.: Pulmonary deposition and clearance of inhaled or instilled  $^{198}\text{Au}$ -colloid in the rat after the induction of pulmonary delayed type hypersensitivity reactions. *Hoken Butsuri*, **23**, 295-302, 1988.

## 6. 超ウラン元素の生体除染に関する研究

松 岡 理, 佐 藤 宏 (内部被ばく研究部)

### Removal of Transuranic Elements by DTPA

Osamu Matsuoka and Hiroshi Sato  
Division of Comparative Radiotoxicology

Effect of calcium diethylenetriaminepenta-acetic acid (Ca-DTPA) and macrophage activating substances, lipopolysaccharide (LPS) and zymosan, on  $^{59}\text{Fe}$  release from rabbit alveolar macrophages which ingested  $^{59}\text{Fe}$ -iron dextran was studied in vitro. The alveolar macrophages harvested by lung lavage, loaded with the  $^{59}\text{Fe}$ -iron dextran were cultured in Hanks' balanced salt solution at  $37^\circ\text{C}$  for 8 hrs with or without the agents. With the addition of Ca-DTPA, the  $^{59}\text{Fe}$  release was increased to about 4-fold of the control level. The effect of LPS or zymosan was not as large that of Ca-DTPA, but the simultaneous use of LPS or zymosan with Ca-DTPA enhanced the more elevated  $^{59}\text{Fe}$  release.

The experimental treatments with Ca- and  $\text{H}_5$ -DTPA were carried out in rats of which lungs were instilled with  $^{59}\text{Fe}$ -iron dextran. After the instillation, the animals were treated by DTPA on the 2nd day and sacrificed on the 7th day. The lung retention of  $^{59}\text{Fe}$  was significantly decreased and the urinary excre-

tion was remarkably increased by the intratracheal instillation of Ca-DTPA. While the intratracheal instillation  $\text{H}_5$ -DTPA significantly increased the urinary excretion of  $^{59}\text{Fe}$ , its effectiveness was about half that of Ca-DTPA.

$\text{H}_5$ -DTPA was administered by the subcutaneous implantation and Ca-DTPA by the intraperitoneal injection 30 min or 24 hr after the intravenous injection of  $^{59}\text{Fe}$ -iron dextran. The tissue distribution of  $^{59}\text{Fe}$  was not largely different between the treatments of the two chelating agents. The excretion of  $^{59}\text{Fe}$  into the feces was increased with both  $\text{H}_5$ - and Ca-DTPA to about 7 times of that of the control. With respect to the fecal excretion, the effect of  $\text{H}_5$ -DTPA was the same level as that of the Ca-DTPA treated group. On the other hand, the urinary excretion was strongly increased by the  $\text{H}_5$ -DTPA treatment and the effect was 3.4 times of that in the Ca-DTPA treated rats.

#### 1. 緒 言

超ウラン元素であるプルトニウム (Pu) を体内に摂取した場合に、最初の治療法として考えられるのがキレート剤投与である。Pu の摂取経路は、吸入により気道内へ分布、沈着する場合と、血流に入り全身へ分布、沈着する場合の2つに大別される。吸入の場合、特に重要なのは不溶性の粒子状 Pu であり、これは気道表面に沈着し、一

部は肺胞マクロファージ (AM) 内に取り込まれる。DTPA に代表される水溶性キレート剤は細胞膜を通過できないことから細胞内に取り込まれた Pu に対する除去効果はほとんどないといわれているが、AM 内の Pu は時間の経過と共に徐々に可溶化され細胞外へ放出される。そのうちの大部分は肺に沈着するが、一部は血流により他の組織に移行し再沈着すると考えられている。この考えに基づくならば、AM 周囲にキレート剤が

存在することにより細胞外へ放出された Pu と結合して尿中へ排泄されることが十分に期待される。そこで生体内での挙動が Pu と近似していると考えられる鉄を使用し、そのコロイドを食させた AM からの鉄の放出に与えるキレート剤の効果、さらに、マクロファージ (Mφ) の活性化により Mφ 内での可溶化が促進されることが考えられることから、キレート剤と Mφ 活性化物質との併用による効果について検討した。また、H<sub>5</sub>-DTPA は不溶性のキレート剤であるが、その懸濁液を肺に投与した場合、粒子状の H<sub>5</sub>-DTPA が AM 内に取り込まれて可溶化され Pu と結合し AM 外へ放出されるならば除去効果が促進されることが考えられる。この点について Ca-DTPA との効力の比較検討を行った。さらに、H<sub>5</sub>-DTPA の懸濁液を透析チューブにいれて体内に埋め込んだ場合、チューブ内の H<sub>5</sub>-DTPA が体液により徐々に可溶化されて血液中に供給されることから血中の DTPA 濃度を比較的長時間維持できると推測される。したがって、全身に分布した Pu に対して従来の Ca-DTPA 注射投与と比較してより強い効果が得られる可能性があり、この点については鉄を静脈内投与したラットを使用して Ca-DTPA 腹腔内投与と H<sub>5</sub>-DTPA 埋め込みとの効力比較を検討した。

## 2. 研究方法

a. AM の採取：ウサギ（日本白色、雄、体重 2.5-2.8kg）をペントバルビタール麻酔下で放血致死させ、Dulbecco のリン酸緩衝液 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) で肺洗浄を 2 回実施した後、得られた肺洗浄液の遠沈により細胞画分を分離した。イーグルの MEM 培地 (EMEM) で 3 回洗浄し、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む EMEM に浮遊させた。細胞濃度を  $5 \times 10^5$ /ml に調整した浮遊液を直径 10cm の培養用ディッシュに加え、95%air-5%CO<sub>2</sub> 気相下、37℃で 4 時間培養し、非附着性細胞を除去する。附着細胞は 10%FCS-EMEM 下で一晩培養した後 EMEM で 2、3 回洗浄し、得られたものを AM 画分として使用した。

b. <sup>59</sup>Fe-鉄デキストランの調整：<sup>59</sup>Fe-塩化鉄（比放射能 481MBq/mgFe）の 0.5M 塩酸溶液に 1% (w/v) 塩化第 2 鉄溶液 2ml を加えた後、黄色の塩化鉄溶液が赤褐色の水酸化鉄コロイドに変換するまで沸騰水を少量ずつ加えた。生成したコロイド溶液は透析により <sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup> を除去した後、デキストラン（分子量 50 万）を添加して（最

終濃度 2% (w/v) コロイドを安定化させた。最後に 0.25M グルコースで等張とした。

c. <sup>59</sup>Fe-トランスフェリンの調整：<sup>59</sup>Fe-塩化鉄の 0.5M 塩酸溶液を 10% (w/v) のクエン酸 3 ナトリウム溶液で中性とした後、ウサギ血清 1ml と 37℃でインキュベートしてトランスフェリン (TF) と結合させた。TF と非結合のクエン酸鉄は限外濾過により除去した。<sup>59</sup>Fe-TF 溶液はミリポアフィルターを通過させることにより滅菌した。<sup>59</sup>Fe の放射能濃度は 0.47MBq/ml であった。

d. <sup>59</sup>Fe 放出率の算定：AM を 10<sup>6</sup>/ml の濃度で 10%FCS を含むハンクス液 (HBSS-FCS) に浮遊させ、<sup>59</sup>Fe-鉄デキストランを添加して 37℃、2 時間インキュベートして AM に取り込ませた。その AM 画分を HBSS で 3 回洗浄して細胞表面に吸着した <sup>59</sup>Fe-鉄デキストランを除去し、更に水酸化鉄の凝集物を除去するために AM 浮遊液を Ficoll-Paque に重層、遠沈した。Ficoll-Paque 層と HBSS 層の境界画分を採取し、その <sup>59</sup>Fe 放射活性を測定した後、滅菌したプラスチック試験管に 10<sup>3</sup>cpm/0.5ml/tube となるように調整、分注した。薬物を添加し 37℃で 8 時間インキュベートし、冷 HBSS 1.0ml 添加により反応を停止させた後、遠沈上清 1.0ml (A) を採取し、沈渣を含む上清 0.5ml (B) とともに <sup>59</sup>Fe 放射活性をオートガンマウェルカウンタにより測定した。式①に基づき、測定値 A および B より AM からの <sup>59</sup>Fe の放出率を算定した。

$$\text{放出率 (\%)} = [1.5A / (A+B)] \times 100 \cdots \text{①}$$

e. <sup>59</sup>Fe 取り込み率の算定：HBSS-FCS に浮遊させた AM に <sup>59</sup>Fe-TF を添加し、薬物存在下 37℃で 1、2、4、8 時間インキュベート後、冷 HBSS を 0.7ml 添加、遠沈して上清 1.0ml (A) を採取した。沈渣は HBSS で 5 回洗浄した後、洗浄液 (B) 及び沈渣 (C) の放射活性を測定し、A、B、C の各測定値より式②にて <sup>59</sup>Fe の取り込み率を算定した。

$$\text{取り込み率 (\%)} = [C / (A+B+C)] \times 100 \cdots \text{②}$$

f. <sup>59</sup>Fe-鉄デキストランの気管内投与：ウィスター系の雄ラット（体重 310-390 g）をペントバルビタール麻酔下で頸部切開により気管を露出させ、気管軟骨間に注射針で穴を開けナイロンカニューレを気管第 1 分岐部まで挿入して固定し

た。 $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストラン溶液 0.5ml をシリンジに取り、空気と共に少量ずつ注入した。切開部は縫合用クリップで塞いだ後、ラットは個別ケージにて飼育した。

g.  $\text{H}_5\text{-DTPA}$  の埋め込み：麻酔下でラット背部中央よりやや尾部側の皮膚を横に約 1 cm 切開し、ピンセットで皮下にポケットを作った。 $\text{H}_5\text{-DTPA}$  の 0.25M グルコース懸濁液 0.5ml の入った透析チューブ (径 6.4mm) をポケット内に挿入後、縫合用クリップで切開部を塞いだ。

h.  $\text{DTPA}$  の定量：血清 0.1ml の 0.05M 硝酸 25ml に添加し、更に呈色薬として 0.15% (w/v) キシレノールオレンジの 50% エタノール溶液 0.05ml を添加した後 1mM 硝酸ビスマス ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ) で滴定を行った。溶液の色が黄色から淡赤色に変化するまでの  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  の添加量より式③に基づいて  $\text{DTPA}$  の濃度を算定した。

$$\mu\text{mol/ml} = \frac{\text{添加した } \text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \text{ の量 (ml)}}{\times 1\text{mM}(\text{NO}_3)_3 \text{ の濃度}} \dots \textcircled{3}$$

式③は  $\text{Bi}^{3+} 1\text{mol}$  が  $\text{DTPA} 1\text{mol}$  と結合することに基づいたものである。

### 3. 結果

#### a. in vitro 系での $\text{DTPA}$ の効果

1)  $^{59}\text{Fe}$  放出に対する効果：AM からの  $^{59}\text{Fe}$  放出は  $\text{Ca-DTPA} 10\text{mM}$  添加 8 時間で著しく促進され、図 1 に示したように対照の 4 倍に達した。この促進効果は  $\text{M}\phi$  活性化物質である  $\text{LPS}$  の同時添加で更に増強された。特に  $\text{Ca-DTPA}$  と  $\text{LPS} 50\mu\text{g/ml}$  の同時添加で対照の 5.7 倍、 $\text{Ca-DTPA}$  単独添加と比較しても 1.4 倍の放出率を示した。しかし、 $\text{LPS}$  や  $\text{zymosan}$  単独では有意

な放出促進は認められなかった。

2)  $^{59}\text{Fe}$  の AM 内取り込みに対する影響：結果は表 1 に示した。 $^{59}\text{Fe-TF}$  の AM 内への取り込みを経時的に検討したところ、1、2、4、8 時間で取り込み率がほぼ直線的に増加する結果が得られた。 $\text{Ca-DTPA} 10\text{mM}$  でも取り込みは直線的に増加したが、各時間の取り込み率は共に対照群の 60% に抑えられた。一方、 $\text{LPS}$  および  $\text{zymosan}$  では 1 時間で取り込み率の有意な低下が見られたものの 2、4、8 時間では対照との間に差はなかった。

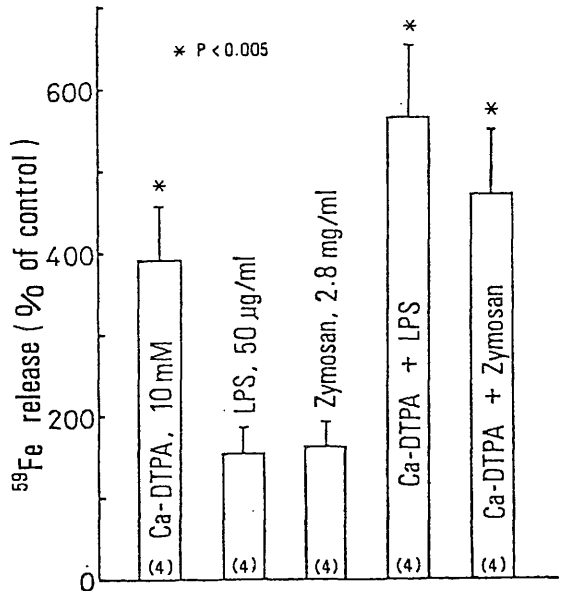


図 1 肺胞マクロファージからの  $^{59}\text{Fe}$  放出に対する  $\text{Ca-DTPA}$ ,  $\text{LPS}$  および  $\text{zymosan}$  の効果

表 1. 肺胞マクロファージへの  $^{59}\text{Fe-TF}$  の取り込みに対する  $\text{Ca-DTPA}$ ,  $\text{LPS}$  および  $\text{zymosan}$  の影響

Treatment	Time after treatment (hrs)			
	1	2	4	8
Control	$0.78 \pm 0.01$ (2)	$1.38 \pm 0.02$ (2)	$2.51 \pm 0.26$ (2)	$4.92 \pm 0.63$ (2)
Ca-DTPA 10 mM	$0.53 \pm 0.06^{**}$ (2)	$0.81 \pm 0.04^{**}$ (2)	$1.74 \pm 0.01^*$ (2)	$2.85 \pm 0.23^{**}$ (2)
LPS 50 $\mu\text{g/ml}$	$0.61 \pm 0.05^{\#}$ (2)	$1.34 \pm 0.06$ (2)	$2.71 \pm 0.18$ (2)	$4.90 \pm 0.11$ (2)
Zymosan 2.8 mg/ml	$0.65 \pm 0.03^*$ (2)	$1.16 \pm 0.05$ (2)	$2.38 \pm 0.06$ (2)	$4.45 \pm 0.21$ (2)

b. in vivo 系（肺負荷）での DTPA の効果

1) 気管内投与した  $^{59}\text{Fe}$ — 鉄デキストラン の体内分布：表 2 は  $^{59}\text{Fe}$ — 鉄デキストランを気管内投与して 2 日および 9 日後の肺、肝、carcass における滞留率を示したものである。滞留率は DTPA 投与時（ $^{59}\text{Fe}$  負荷後 2 日目）の全

身滞留量を 100% として表したものである。2 日後と 9 日後の肺および肺洗浄液の滞留率は共に 75% および 12% であり、2 日から 9 日の 1 週間では見かけ上ほとんど肺から他の組織への移行がないことが示された。

表 2.  $^{59}\text{Fe}$ — 鉄デキストランを気管内投与したラットにおける  $^{59}\text{Fe}$  滞留率の変化。

Day after instillation	No. of rats	Lung	Lavage sup.	BAC	Sup/BAC (ratio)	Liver	Carcass
2nd day	4	75.9 $\pm$ 1.1	9.2 $\pm$ 1.6	2.8 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 1.3	0.93 $\pm$ 0.16	11.3 $\pm$ 1.6
9th day	8	75.2 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 1.2

ただし、肺洗浄液を非細胞画分と細胞画分とに分けた場合、細胞画分に存在する  $^{59}\text{Fe}$  の肺洗浄液全体に対する割合は 2 日目の 23% から 9 日目の 38% に増加した。一方、carcass の  $^{59}\text{Fe}$  滞留率は 2 日目からの 1 週間で 2.9% 減少し、逆に、肝の滞留率は 0.7% 増加した。糞尿を介して体外へ排泄された割合は 2.2% であった。（表 4 参照）

2) 気管内投与した  $^{59}\text{Fe}$  に対する DTPA の効果：表 3 に示したように Ca-DTPA30, 300

$\mu\text{mol/rat}$  の腹腔内投与では肺の  $^{59}\text{Fe}$  滞留率に対照との差はみられなかった。糞尿への排泄率の増加も認められなかった。（表 4 参照）  $\text{H}_5$ -DTPA 埋め込みも、 $^{59}\text{Fe}$  の体内分布、排泄共に対照との間に有意な差はみられなかった。一方、Ca-DTPA を気管を介して肺へ注入した場合、肺の  $^{59}\text{Fe}$  滞留率は対照の 75% から 63% へ有意に低下した。それに対し、肝の滞留率は増加した。carcass においても増加傾向を示した。肺洗浄液

表 3.  $^{59}\text{Fe}$ — 鉄デキストランを気管内投与したラットの  $^{59}\text{Fe}$  体内分布に対する Ca-DTPA の気管内投与および腹腔内投与、 $\text{H}_5$ -DTPA の皮下埋め込みの影響。

Treatment	No. of rats	Lung	Lavage sup.	BAC	Sup/BAC (ratio)	Liver	Carcass
Saline	8	75.2 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 1.2
Ca-DTPA, I.T. 30 $\mu\text{mol/rat}$	5	62.8 $\pm$ 2.0 <sup>*1</sup>	13.7 $\pm$ 6.6	4.7 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>	11.5 $\pm$ 1.0
300	5	62.8 $\pm$ 2.9 <sup>*1</sup>	11.6 $\pm$ 2.2	3.5 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 1.0 <sup>*3</sup>	2.9 $\pm$ 0.3 <sup>*1</sup>	12.1 $\pm$ 1.0
Ca-DTPA, I.P. 30 $\mu\text{mol/rat}$	2	73.7 $\pm$ 0.3	8.5 $\pm$ 1.5	7.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.4
300	4	75.8 $\pm$ 5.1	6.3 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.7	8.3 $\pm$ 2.0
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol/rat}$	3	80.0 $\pm$ 2.5	4.7 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 2.1

表4.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを気管内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 排泄に対するCa-DTPAの気管内および腹腔内投与、 $\text{H}_5$ -DTPAの皮下埋め込みの影響。

Treatment	No. of rats	Feces		Urine	
		1st day	Total	1st day	Total
Saline	8	$0.52 \pm 0.12$	$1.9 \pm 0.2$	$0.07 \pm 0.02$	$0.31 \pm 0.07$
Ca-DTPA, I.T. 30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	5	$1.8 \pm 0.8$	$3.9 \pm 1.4$	$0.87 \pm 0.11^{*1}$	$1.4 \pm 0.1^{*1}$
300	5	$1.4 \pm 0.4^{*4}$	$3.5 \pm 0.4^{*2}$	$2.9 \pm 0.3^{*1}$	$3.6 \pm 0.3^{*1}$
Ca-DTPA, I.P. 30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	2	$0.33 \pm 0.09$	$1.4 \pm 0.3$	$0.06 \pm 0.02$	$0.30 \pm 0.08$
300	4	$1.4 \pm 0.9$	$3.1 \pm 1.3$	$0.14 \pm 0.08$	$0.49 \pm 0.20$
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	3	$0.43 \pm 0.18$	$2.1 \pm 0.5$	$0.06 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.02$

中に存在する $^{59}\text{Fe}$ の割合を比較した場合、30、300 $\mu\text{mol}$ で共に対照の約1/2に低下した。糞尿への排泄についての結果は表4にまとめて示した。尿への排泄はCa-DTPA30 $\mu\text{mol}$ 投与1日目の尿中排泄で対照の12倍に増加した。300 $\mu\text{mol}$ では更に排泄が促進された。

3) 気管内投与した $\text{H}_5$ -DTPA, Ca-DTPAの効力の比較： $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランの気管内投与2日後に $\text{H}_5$ -DTPA, Ca-DTPA共に30, 100, 150 $\mu\text{mol}$ を気管内投与した時の結果

は表5および6に示した。Ca-DTPA100, 150 $\mu\text{mol}$ では肺への $^{59}\text{Fe}$ 滞留率が有意に低下した。 $\text{H}_5$ -DTPAではCa-DTPAより効果は弱いものの滞留率が減少する傾向がみられた。肺洗浄液全体に対する非細胞画分中の $^{59}\text{Fe}$ 分布の割合はCa-DTPA150 $\mu\text{mol}$ でのみ有意な増加がみられた。肝についてはCa-DTPA30, 100, 150 $\mu\text{mol}$ 、 $\text{H}_5$ -DTPA150 $\mu\text{mol}$ 、carcassではCa-DTPA150 $\mu\text{mol}$ でのみ有意な滞留増加がみられた。表6は排泄に対する効果をまとめたもので

表5.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを気管内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 体内分布に対するCa-および $\text{H}_5$ -DTPAの気管内投与の影響。

Treatment	No. of rats	Lung	Lavage sup.	BAC	Sup/BAC (ratio)	Liver	Carcass
Saline	7	$87.3 \pm 1.7$	$3.4 \pm 0.8$	$2.0 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.4$	$0.37 \pm 0.04$	$3.8 \pm 0.6$
Ca-DTPA, I.T. 30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	5	$82.9 \pm 1.0$	$5.5 \pm 0.9$	$3.1 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.4$	$0.89 \pm 0.15^{*1}$	$5.2 \pm 0.9$
100	2	$76.3 \pm 3.9^{*3}$	$8.7 \pm 1.2$	$4.1 \pm 1.5$	$2.3 \pm 0.6$	$0.95 \pm 0.39^{*3}$	$5.0 \pm 0.2$
150	3	$75.4 \pm 2.4^{*1}$	$5.8 \pm 1.6$	$1.4 \pm 0.7$	$4.7 \pm 1.7^{*4}$	$1.8 \pm 0.1^{*1}$	$8.7 \pm 0.6^{*1}$
$\text{H}_5$ -DTPA, I.T. 30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	5	$85.7 \pm 0.8$	$4.5 \pm 0.5$	$3.1 \pm 0.4$	$1.5 \pm 0.2$	$0.53 \pm 0.10$	$3.2 \pm 0.4$
100	3	$84.2 \pm 1.5$	$5.2 \pm 0.3$	$4.7 \pm 1.3$	$1.3 \pm 0.3$	$0.52 \pm 0.12$	$3.2 \pm 0.5$
150	2	$81.9 \pm 2.0$	$3.9 \pm 0.1$	$3.6 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.2$	$0.99 \pm 0.28^{*1}$	$5.4 \pm 1.3$

表 6.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを気管内投与したラットの  $^{59}\text{Fe}$  排泄に対する Ca- および  $\text{H}_5$ -DTPA の気管内投与の影響。

Treatment	No. of rats	Feces		Urine	
		1st day	Total	1st day	Total
Saline	7	$0.32 \pm 0.11$	$2.1 \pm 0.3$	$0.05 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.03$
Ca-DTPA					
30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	5	$0.29 \pm 0.16$	$1.6 \pm 0.2$	$0.55 \pm 0.19^{*2}$	$0.72 \pm 0.23^{*2}$
100	2	$0.52 \pm 0.26$	$2.9 \pm 0.9$	$1.6 \pm 0.3^{*1}$	$1.8 \pm 0.3^{*1}$
150	3	$0.71 \pm 0.05$	$3.2 \pm 0.4^{*4}$	$3.4 \pm 0.5^{*1}$	$3.7 \pm 0.4^{*1}$
$\text{H}_5$ -DTPA					
30 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	5	$0.50 \pm 0.28$	$2.6 \pm 0.6$	$0.22 \pm 0.07^{*4}$	$0.29 \pm 0.08^{*3}$
100	3	$0.26 \pm 0.06$	$1.8 \pm 0.1$	$0.30 \pm 0.06^{*1}$	$0.38 \pm 0.07^{*1}$
150	2	$0.45 \pm 0.14$	$2.2 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1^{*1}$	$1.2 \pm 0.2^{*1}$

あるが、DTPA 投与群すべてにおいて対照群に対し有意な増加を認めた。Ca-DTPA と  $\text{H}_5$ -DTPA の効力を比較した場合、いずれの用量においても Ca-DTPA の方が2.5-5.2倍高い値を示した。

c. in vivo 系 (全身負荷) での DTPA の効果

1) 血中 DTPA 濃度の経時変化: マウス (C3H、雄、体重33-47 g) に Ca-DTPA-3mmol/kg を腹腔内注射、 $\text{H}_5$ -DTPA120 $\mu\text{mol}$  を背部皮下に埋め込んだ後、10分から24時間までの適当な間隔で頸動脈切断により採血した。遠慮後に得られた血清中の DTPA を定量した結果、

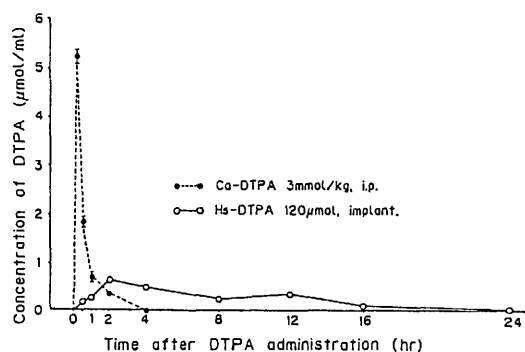


図 2 Ca-DTPA の腹腔内投与、 $\text{H}_5$ -DTPA の皮下埋め込みによるマウスの血中 DTPA 濃度の経時変化。

図 2 に示したように Ca-DTPA 腹腔内注射では 10分で  $5.2\mu\text{mol}/\text{ml}$  に達した後、急速に低下し 2 時間で  $0.2\mu\text{mol}/\text{ml}$ 、4 時間では既に検出できなかった。それに対し、 $\text{H}_5$ -DTPA では30、60分後にそれぞれ  $0.16$ 、 $0.23\mu\text{mol}/\text{ml}$  であり、4 時間でほぼ最高濃度に達した。その後徐々に低下し 16時間後は  $0.08\mu\text{mol}/\text{ml}$  であった。

2) 静脈内投与した  $^{59}\text{Fe}$  に対する DTPA 即時投与の効果: 表 7 は  $^{59}\text{Fe}$ -デキストラン投与30分後に DTPA を投与して 7 日後の  $^{59}\text{Fe}$  の体内分布を示したものである。 $\text{H}_5$ -DTPA300  $\mu\text{mol}/\text{rat}$ 、Ca-DTPA1mol/kg で肝の滞留率はそれぞれ54%、51%であり対照群の74%に対し有意に低下した。腎、大腿骨では逆に増加したが、脾では変化はみられなかった。carcass の滞留率は  $\text{H}_5$ -DTPA で1.5倍に増加し、Ca-DTPA では  $\text{H}_5$ -DTPA より更に増加した。糞尿排泄に対する効果は表 8 に示した。 $\text{H}_5$ - および Ca-DTPA 投与 1 日目の  $^{59}\text{Fe}$  の糞中排泄率は共に対照の約 7 倍に増加し、1 週間の総排泄率で比較した場合でも  $\text{H}_5$ - および Ca-DTPA 投与によりそれぞれ2.6、2.3倍に達した。一方、尿中排泄は Ca-DTPA 投与後 1 日目の排泄率が対照群の 0.01%から1.8%に増加し、 $\text{H}_5$ -DTPA 投与では更に強い排泄増加がみられ Ca-DTPA 投与の 3.4倍に達した。

3) 静脈内投与した  $^{59}\text{Fe}$  に対する DTPA 遅延投与の効果: 表 9 は  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキトラン投

表7.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを静脈内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 体内分布に対するCa-DTPAの腹腔内投与および $\text{H}_5$ -DTPAの皮下埋め込みの影響。 $^{59}\text{Fe}$ 負荷30分後にDTPAを投与。

Treatment	No. of rats	Liver	Spleen	Kidney	Femurs	Carcass	Blood( $\text{ml}^{-1}$ )
Saline	6	74.2 $\pm$ 2.0	1.1 $\pm$ 0.1	0.55 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.02	22.0 $\pm$ 2.0	1.0 $\pm$ 0.04
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	7	54.3 $\pm$ 1.5 <sup>*1</sup>	1.1 $\pm$ 0.1	0.93 $\pm$ 0.03 <sup>*1</sup>	0.67 $\pm$ 0.02 <sup>*1</sup>	32.2 $\pm$ 2.0 <sup>*1, #3</sup>	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>*1, #4</sup>
Ca-DTPA, I.P. 1 mmol/kg	6	51.4 $\pm$ 2.0 <sup>*1</sup>	1.2 $\pm$ 0.1	0.85 $\pm$ 0.06 <sup>*1</sup>	0.63 $\pm$ 0.02 <sup>*1</sup>	40.1 $\pm$ 2.0 <sup>*1</sup>	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>

表8.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを静脈内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 排泄に対するCa-DTPAの腹腔内投与および $\text{H}_5$ -DTPAの皮下埋め込みの効果。 $^{59}\text{Fe}$ 負荷30分後にDTPAを投与。

Treatment	No. of rats	Feces		Urine		Whole Body
		1st day	Total	1st day	Total	
Saline	6	0.10 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.1	0.01 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	98.3 $\pm$ 0.2
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	7	0.71 $\pm$ 0.12 <sup>*1</sup>	4.5 $\pm$ 0.2 <sup>*1, #2</sup>	6.1 $\pm$ 0.8 <sup>*1, #1</sup>	6.3 $\pm$ 0.9 <sup>*1, #1</sup>	89.3 $\pm$ 0.7 <sup>*1, #1</sup>
Ca-DTPA, I.P. 1 mmol/kg	6	0.66 $\pm$ 0.18 <sup>*2</sup>	3.9 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>	1.8 $\pm$ 0.4 <sup>*1</sup>	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>*1</sup>	94.2 $\pm$ 0.5 <sup>*1</sup>

表9.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを静脈内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 体内分布に対するCa-DTPAの腹腔内投与および $\text{H}_5$ -DTPAの皮下埋め込みの影響。 $^{59}\text{Fe}$ 負荷24時間後にDTPAを投与。

Treatment	No. of rats	Liver	Spleen	Kidney	Femurs	Carcass	Blood( $\text{ml}^{-1}$ )
Saline	8	72.4 $\pm$ 2.3	0.76 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.03	23.7 $\pm$ 2.1	1.2 $\pm$ 0.1
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	7	53.1 $\pm$ 2.5 <sup>*1</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>*1</sup>	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>*1</sup>	0.63 $\pm$ 0.02 <sup>*1</sup>	36.2 $\pm$ 2.6 <sup>*1</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>*3, #1</sup>
Ca-DTPA, I.P. 1 mmol/kg	6	50.4 $\pm$ 2.0 <sup>*1</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>*1</sup>	0.90 $\pm$ 0.05 <sup>*1</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>*1</sup>	42.1 $\pm$ 1.8 <sup>*1</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>

表10.  $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランを静脈内投与したラットの $^{59}\text{Fe}$ 排泄に対するCa-DTPAの腹腔内投与および $\text{H}_5$ -DTPAの皮下埋め込みの効果。 $^{59}\text{Fe}$ 負荷24時間後にDTPAを投与。

Treatment	No. of rats	Feces		Urine		Whole Body
		1st day	Total	1st day	Total	
Saline	6	0.21 $\pm$ 0.03	2.0 $\pm$ 0.2	0.01 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	97.9 $\pm$ 0.2
$\text{H}_5$ -DTPA, Implant. 300 $\mu\text{mol}/\text{rat}$	7	0.56 $\pm$ 0.07 <sup>*1</sup>	4.3 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>	3.8 $\pm$ 0.6 <sup>*1, #1</sup>	3.9 $\pm$ 0.6 <sup>*1, #1</sup>	91.8 $\pm$ 0.5 <sup>*1, #1</sup>
Ca-DTPA, I.P. 1 mmol/kg	6	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>*1</sup>	4.0 $\pm$ 0.2 <sup>*1</sup>	0.74 $\pm$ 0.25 <sup>*1</sup>	0.83 $\pm$ 0.26 <sup>*1</sup>	95.2 $\pm$ 0.3 <sup>*1</sup>

与24時間後に DTPA を投与して7日後の $^{59}\text{Fe}$ の体内分布を示したものである。肝では  $\text{H}_5\text{-DTPA}$ ,  $\text{Ca-DTPA}$  で共に対照の約70%に滞留率が低下した。腎、大腿骨、carcass の滞留率は即時投与の場合と同様に増加した。しかし、脾の滞留率は即時投与の場合とは異なり増加した。表10に示したように  $\text{H}_5\text{-}$  および  $\text{DTPA}$  投与後24時間で糞中へ排泄された $^{59}\text{Fe}$ の割合はそれぞれ対照の2.7および2.3倍であり、 $\text{Ca-DTPA}$  と  $\text{H}_5\text{-DTPA}$  投与群の間に差はなかった。それに対し尿中排泄率は  $\text{H}_5\text{-DTPA}$  の方が  $\text{Ca-DTPA}$  より高い値を示した。すなわち、 $\text{Ca-DTPA}$  では投与後24時間の排泄率が対照の0.01%から0.74%に増加したが、 $\text{H}_5\text{-DTPA}$  投与では更に5倍高い排泄率を示した。しかし、 $\text{DTPA}$  投与1~7日までの6日間の排泄率は対照、 $\text{H}_5\text{-}$  および  $\text{Ca-DTPA}$  でそれぞれ0.04%、0.1%、0.09%であり初めの24時間で見られたような著しい効果はなかった。

#### 4. 討 論

一般に培養細胞では、鉄の代謝は培養液中と細胞内との鉄の量および結合能力に依存した動的平衡関係により行われている。 $^{59}\text{Fe}$ -鉄デキストランはM $\phi$ に取り込まれライソゾーム内で可溶化され鉄イオンまたは微粒子の形で細胞質へ移行する。鉄イオンはフェリチンとして貯蔵され動的平衡に関与する鉄の供給源となる。

$^{59}\text{Fe}$ の放出実験ではインキュベーション開始時における細胞内の鉄の量は培養液中より多い状態にある。したがって、平衡は鉄を細胞から培養液中に放出する方向に傾いている。対照では1、2、4、8時間のいずれの場合も放出される割合はAMに取り込まれた $^{59}\text{Fe}$ の1~2%の範囲であった。これは鉄イオンの結合は可逆的であって培養液中の $^{59}\text{Fe}$ の割合が1~2%で動的平衡に達していることを示すものである。TFに対する $^{59}\text{Fe}$ の結合定数はDTPAのそれよりも大きく、TFとDTPAのモル比が1では $^{59}\text{Fe}$ の大部分はTFに結合する。しかし、DTPAの濃度が100倍以上高い場合は大部分がDTPAに結合することが報告されている。本実験系においては、DTPAの濃度はTFの約3,000倍であり、培養液中に放出された $^{59}\text{Fe}$ のほとんどはDTPAと結合し、しかも $^{59}\text{Fe}$ の結合能力にはかなりの余裕が残されていると考えられる。培養液中へは $^{59}\text{Fe}$ -TFとして放出されるが、DTPAが存在する

ことによりAM内への再取り込みが抑制される。(表1)したがって、平衡は $^{59}\text{Fe}$ がAM内から培養液中へ放出される方向に傾き、DTPAの結合能力が飽和に達するまで放出は続くと考えられる。 $\text{Ca-DTPA}$ 10mMにより対照の4倍に達したことは、この推測を裏付けている。(図1)以上のように $\text{Ca-DTPA}$ による $^{59}\text{Fe}$ 放出促進は $^{59}\text{Fe}$ の再取り込み抑制の結果と考えられるが、LPSやzymosanは $^{59}\text{Fe}$ の再取り込みに影響を与えないにもかかわらず $^{59}\text{Fe}$ 放出は促進される。また、 $\text{Ca-DTPA}$ との同時添加はLPSのみが相乗的に作用しておりzymosanではその効果は認められなかった。本実験のみではM $\phi$ 活性化物質による $^{59}\text{Fe}$ 放出促進のメカニズムは明かにすることはできないがLPS, zymosanがAM内の食食物消化を促進することを考え合わせると $\text{Ca-DTPA}$ の場合とは異なると考えられる。

実際に $^{59}\text{Fe}$ を肺に負荷した動物では、表2及び4から解るように $^{59}\text{Fe}$ 負荷2日目に肺以外の組織(肝+carcass)に滞留する $^{59}\text{Fe}$ 量は9日目の滞留量と2~9日の1週間の排泄量の和に等しい。これは2日間で初期排泄が終了し、以後の7日間では肺から他の組織への移行がほとんどないことを示している。肺洗浄液中の非細胞画分と細胞画分に存在する $^{59}\text{Fe}$ との比率を見ると2日目の4.0から9日目では1.8に低下している。これは、肺胞表面に存在する $^{59}\text{Fe}$ がAMにより取り込まれ、可溶化されてAM外へ放出されるがin vitro系とは異なり、再取り込みされずに周囲の組織成分に保持されたままになっているためではないかと考えられる。

$\text{Ca-DTPA}$ の気管内投与では肺の $^{59}\text{Fe}$ は $\text{Ca-DTPA}$ と結合して $^{59}\text{Fe-DTPA}$ が形成され、肺胞周囲に再沈着することなく血流へ移行し尿中へ排泄される。又、肝へ移行したものは胆汁を介して糞中へ排泄される。 $\text{Ca-DTPA}$ の腹腔内投与では体内分布、排泄への影響はほとんど見られない。(表3、4)これは投与した $\text{Ca-DTPA}$ が肺まで到達せず、しかも2日目では $^{59}\text{Fe}$ のほとんどが肺に滞留した状態にあるためであろう。

緒言で記述したように不溶性の $\text{H}_5\text{-DTPA}$ はAMに取り込まれた後、キレート結合可能な形として徐々にAM外へ放出されると考えられる。したがって、肺に長期間DTPAが存在することになり除去効果が増強される可能性が高い。しかしながら、表5、6の結果は $\text{Ca-DTPA}$ より効

果が弱いことを示すものである。原因として考えられるのは懸濁液として投与した  $H_5$ -DTPA の粒子径が大きかったために大部分が上部気道にとどまり粘液纖毛運動により消化管を介して排泄され  $^{59}Fe$  が存在する肺深部まで到達できず、十分な効果が得られなかったと思われる。

$H_5$ -DTPA の利用法として考えられるのは全身投与における効力増強である。実際には、 $H_5$ -DTPA の懸濁液を透析チューブに入れてラットの皮下に埋め込んだが、この方法で従来の  $Ca$ -DTPA 全身投与による除去効果以上の効力が得られるか否かを検討した。 $^{59}Fe$  負荷後30分で  $H_5$ -DTPA を投与した場合、初めの24時間に尿中に排泄される割合は対照と比較して著しく高く  $Ca$ -DTPA 投与との比較でも3.4倍高くなっている。(表8) しかし次の24時間の排泄率がわずか0.06%であり(結果は示さなかった)実験期間の7日間の尿中への総排泄量の大部分が24時間以内に集中していることは  $H_5$ -DTPA の効果が24時間以上は持続しないことを示唆する。16時間で  $0.01\mu\text{mol/ml}$  以下であり、これは上記の結果を裏付けるものである。(図2) Taylor らは  $Zn$ -DTPA の単独投与を分割投与に変えることにより  $Pu$  除去が50%増強されることを報告している。本実験では  $H_5$ -DTPA の使用により  $Ca$ -DTPA の3.3倍まで  $^{59}Fe$  除去を高めることが可能になり分割投与よりはるかに効力が増強される。一方、1日当りの糞中排泄率は  $Ca$ - および  $H_5$ -DTPA でそれぞれ0.5-0.6%、および0.4-0.8%であり、尿中排泄にみられたような効力の差はみられなかった。そして尿への排泄率ほど高くはないが効果が持続する。このことは  $^{59}Fe$  負荷24時間後の DTPA 投与でも同様である。

DTPA は肝実質細胞に取り込まれるとの報告があり、それは  $^{59}Fe$  と結合して徐々に細胞外へ放出され胆汁中へ排泄される。したがって糞中への持続的排泄は、大部分の DTPA が排泄された後も肝細胞内に残留している一部の DTPA が作用した結果であると推測される。

## 5. 結 論

in vitro 系での AM からの  $^{59}Fe$  放出は  $Ca$ -DTPA により促進されるが、これは in vivo 系において肺に沈着した  $^{59}Fe$  の除去に  $Ca$ -DTPA の気管内投与が有効という結果によく反映されている。また、全身投与では効果がないことや、全身に分布した  $^{59}Fe$  に対しては  $Ca$ -DTPA の全身投与も効果があることが再認識された。更に、効力増強の目的で使用した  $H_5$ -DTPA が、体内に埋め込むという方法で  $Ca$ -DTPA 以上の効力が得られることが確認された。

## 〔研究発表〕

- 1) Sato, H., Kubota, Y., Takahashi, S. and Matsuoka, O.:  $^{59}Fe$  release from alveolar macrophages ingested  $^{59}Fe$ -iron dextran-Enhancement by combination of  $Ca$ -DTPA and macrophage activation substances. *J. Radiat. Res.*, **27**, 105-111, 1986.
- 2) Sato, H., Kubota, Y., Takahashi, S. and Matsuoka, O.: The effect of  $Ca$ -DTPA administered by variuos routes on the removal of  $^{59}Fe$  from the rat lung instilled with  $^{59}Fe$ -iron dextran. *Hoken Butsuri*, **23**, 99-104, 1988.
- 3) Sato, H., Kubota, Y., Takahashi, S. and Matsuoka, O.: Effects of  $H_5$ -DTPA and  $Ca$ -DTPA on the removal of  $^{59}Fe$  from rats injected with  $^{59}Fe$ -iron dextran. *Hoken Butsuri*, **24**, 1989, in press.